

**Theoretische Untersuchungen zur Kopplung von neuronaler  
Erregung und neuronalem Energiestoffwechsel**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Physiker Nikolaus Berndt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Holzhütter

2. Prof. Dr. Kann

3. Prof. Dr. Klipp

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2012



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Prolegomena.....	1
Kapitel 1: Einfluss von Chlorid auf Aktionspotential-generierung und Volumenregulation von erregbaren Zellen.....	4
1.1 Einleitung.....	4
1.2 Modellbeschreibung.....	5
1.3 Ergebnisse.....	8
1.3.1 Die Rolle von Chlorid bei der Regulation des Zellvolumens.....	8
1.3.1.1 Volumenregulation in nicht erregbaren Zellen.....	8
1.3.1.2 Volumenregulation in erregbaren Zellen.....	10
1.3.1.3 Der Einfluss von Chloridströmen auf die Charakteristiken von Pulsfolgen (spike trains).....	11
1.4 Diskussion.....	15
Kapitel 2: Evolutionäres Design und Robustheit neuronaler Zellen am Beispiel von Leckströmen.....	17
2.1 Einleitung.....	17
2.2 Modellbeschreibung.....	18
2.3 Ergebnisse.....	19
2.3.1 Leckströme stabilisieren das Ruhemembranmembran.....	19
2.3.2 Leckströme ermöglichen kontrolliertes Feuern von APs.....	22
2.4 Diskussion.....	24
Kapitel 3: Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs in Hirnschnitten bei verschiedenen Aktivitätszuständen.....	26
3.1 Einführung.....	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Experimentelle Methoden.....	27
3.2.2 Theoretische Methoden– Das Reaktions-Diffusions-Modell (RDM).....	27
3.3 Ergebnisse.....	29
3.3.1 Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs.....	29
3.3.2 Bedeutung für die Sauerstoffversorgung von neuronalen Gewebe <i>in vivo</i> .....	30
3.4 Diskussion.....	31
Kapitel 4: Mathematisches Modell der Kurzzeitregulation des neuronale Energiestoffwechsel.....	34
4.1 Einführung.....	34
4.2 Modellbeschreibung.....	36
4.3 Ergebnisse.....	37
4.3.1 Kalibrierung des Modells und definieren des Referenzzustandes.....	37
4.3.2 Modellbasierte Interpretation der zeitlichen NAD(P)H Profile während verschiedenen Aktivitätszuständen in hippocampalen Hirnschnitten.....	39
4.3.2.1 Störung der spontanen Netzwerkaktivität durch kurzzeitige elektrische Stimulation.....	39
4.3.2.2 Übergang zwischen spontaner Netzwerkaktivität und Gammaoszillation.....	41
4.3.2.3 Störung der Gammaoszillation durch kurzzeitige elektrische Stimulation.....	42
4.3.3 Simulation der durch elektrische Reizung ausgelösten metabolischen Response bei veränderter glykolytischer Kapazität.....	43
4.4 Diskussion.....	45
Kapitel 5: Die Auswirkung einer verminderten $\alpha$ -keto-glutaratdehydrogenase Aktivität auf die ATP-Produktion und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in neuronalen Zellen.....	47

5.1 Einleitung .....	47
5.2 Modell .....	47
5.3 Ergebnisse .....	51
5.3.1 Analyse des normalen mitochondrialen Energiemetabolismus .....	51
5.3.2 Analyse des mitochondrialen Energiemetabolismus bei reduzierter KGDHC Aktivität.....	53
5.3.3 ROS-Erzeugung durch die RC bei KGDHC Inhibierung .....	56
5.4 Diskussion .....	57
Zusammenfassung .....	60
Anhang: .....	62
Anhang Kapitel 1: .....	62
Anhang Kapitel 2: .....	65
Anhang Kapitel 3: .....	69
Anhang Kapitel 4: .....	73
Anhang Kapitel 5: .....	86
Bibliographie .....	97

# Prolegomena

Erregbare Zellen, wie z. B. Neuronen, sind mit einer Vielzahl verschiedener und sich gegenseitig beeinflussender, teilweise sogar behindernder Aufgaben konfrontiert. Wie jede Zelle müssen sie Selbsterhalt und Funktionalität gleichermaßen erfüllen. Zum Selbsterhalt gehört sowohl die energetische Versorgung der Zelle zum Aufrechterhalten vitaler Funktionen wie der Proteinsynthese, als auch die Wahrung zellspezifischer Parameter wie der Zellgröße. Die Zellfunktionalität im Sinne der Informationsverarbeitung und Informationsweiterleitung wird mittels kurzen Auslenkungen des Membranpotentials von seinem Ruhewert von  $-70$  mV auf bis zu  $+50$  mV erreicht. Diese Änderung des Membranpotentials stellt nun besondere Anforderungen an die zellulären Ausstattungen, was wiederum auf die Funktionalität zurückwirkt. Im ersten Kapitel dieser Dissertation geht es um dieses Wechselspiel am Beispiel der Aktionspotentialgenerierung und der osmotischen Stabilität und des Zellvolumens. Die Generierung von Aktionspotentialen ist immer mit der kurzzeitigen Veränderung der Ströme der kleinen Ionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  verbunden, was zu Verschiebungen in den intra- und extrazellulären Ionenkonzentration führt. Wenn diese Änderungen nicht vollständig zurückgestellt werden können, führen die sich akkumulierenden Änderungen in den Transmembranionengradienten zu Änderungen im Zellvolumen und haben Auswirkungen auf die Funktionalität, sowohl in der Form von geänderten Charakteristiken der Aktionspotentiale, wie Dauer, Frequenz und Amplitude, als auch der Erregbarkeit. Die Kanalausstattung der Zelle, insbesondere für Chloridionen, hat Auswirkungen auf die osmotische Stabilität, sowie auf funktionale Aspekte der Erregbarkeit. Um Designprinzipien in diesem Wechselspiel geht es im ersten Kapitel.

Zusätzlich zur Funktionalität ist die Energieeffizienz für jede Zelle von entscheidender Bedeutung. Eine Aufgabe muss nicht nur präzise und stabil unter verschiedenen Bedingungen erfüllt werden, sondern das sollte auch noch möglichst kosteneffizient geschehen. Ausgangspunkt der Betrachtungen in Kapitel 2 ist die Beobachtung, dass der Energieverbrauch des Gehirns im Vergleich mit anderen Organen außerordentlich hoch ist, hauptsächlich aufgrund eines sehr hohen Energiebedarf für die ATP-betriebene Na-K-ATPase, die für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials im Ruhezustand, d. h. ohne dass Aktionspotentiale gefeuert werden, notwendig ist. Der Energieaufwand ist deshalb so hoch, weil eine große Zahl von ständig geöffneten nicht regulierten Kanälen sehr große Leckströme zulassen, gegen die die Na-K-ATPase anarbeiten muss. Diese Tatsache wirft die Frage auf, warum die Permeabilität der passiven Ionenkanäle im Laufe der Evolution nicht gesenkt wurde, um den Energieaufwand für das Gehirn zu senken und damit wertvolle Ressourcen zu sparen, ohne die Funktionalität einzuschränken. Um die Beantwortung dieser Frage geht es im zweiten Kapitel.

Nachdem wir uns mit der Energieeffizienz des Grundzustandes neuronaler Zellen beschäftigt haben, war unsere nächste Frage abzuschätzen, wie teuer im Vergleich zum Ruhezustand der Energieaufwand für die Erregung ist. Dafür wurden (von unseren experimentellen Partnern) hippocampale Hirnschnittkulturen in drei verschiedene Aktivitätszustände versetzt und jeweils der Sauerstoffpartialdruck im Schnitt tiefenabhängig gemessen. Die drei Aktivitätszustände wurden so gewählt, dass sie das größtmögliche Spektrum an Energieverbrauch abdecken, der über lange Zeit aufrechterhalten werden kann. Den minimalen Energieaufwand, der mit dem Selbsterhalt und der Bereitschaft zur Funktionalität verbunden ist, selbst aber keine Kosten für die Verarbeitung, Integration und Weiterleitung von Informationen enthält, wurde erreicht, indem man mittels TTX die schnellen Natriumkanäle blockiert und es dadurch unmöglich macht, Aktionspotentiale zu generieren. Die in diesem Zustand gemessenen stationären Profile für den tiefenabhängigen Sauerstoffpartialdruck wurden dann mit Profilen verglichen, die in Hirnschnitten, die

Spontanaktivität aufweisen, d. h. ohne externen Input Aktionspotentiale generieren, und einen mittleren ‚normalen‘ Aktivitätszustand repräsentieren, verglichen. Als Repräsentant für einen hochaktiven und energetisch sehr aufwendigen funktionalen Zustand wurden Gammaoszillationen gewählt, die durch das Einwaschen des Neurotransmitters Acetylcholin in Gang gesetzt wurden und über lange Zeiten (mehr als 30 Minuten) aufrecht erhalten werden konnten. Beim Vergleich der aufgenommenen tiefenabhängigen stationären Profile der Sauerstoffpartialdrücke fällt auf, dass der Sauerstoffpartialdruck mit höherer Aktivität abnimmt. Das lässt auf einen höheren Sauerstoffverbrauch bei größerer Aktivität der Zellen schließen. Kapitel 3 beschäftigt sich mit der Quantifizierung des aktivitätsabhängigen Sauerstoffverbrauchs und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für die vaskuläre Architektur des Gehirns in vivo.

Da der Energiebedarf von Neuronen abhängig von ihrem Aktivitätszustand sehr unterschiedlich sein kann, ist eine ausreichend schnelle und genaue Regulation des neuronalen Energiestoffwechsels nötig, um das zelluläre ATP-Niveau gegen große Schwankungen im ATP-Verbrauch zu stabilisieren. Bisher ist über die Kurzzeitdynamik des zellulären Energiemetabolismus einzelner Neuronen wenig bekannt. Das kommt vor allem daher, dass es experimentell extrem schwierig oder gar unmöglich ist, zeitabhängig mit einer Auflösung im Sekundenbereich, in dem die metabolischen Anpassungen auftreten, Metabolitkonzentrationen und/oder metabolische Flüsse zu bestimmen. Der vielversprechendste Marker ist das zelluläre Redoxpotential, das durch die Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide NAD(P)H gemessen wird und abhängig von der Stimulation und dem Ausgangszustand der Zellen sehr charakteristische Zeitverläufe aufweist. NADH und NAD<sup>+</sup> sind Kofaktor in einer ganzen Reihe verschiedener Reaktionen im zellulären Energiestoffwechsel. Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit ist es, zum Verständnis der Kurzzeitregulation des neuronalen Energiestoffwechsels beizutragen. Daher haben wir in Kapitel 4 ein detailliertes kinetisches Modell des neuronalen Energiestoffwechsels entwickelt. Es umfasst die Glykolyse, den TCAC, die Atmungskette, die oxidative Phosphorylierung, den Malate-Aspartat-Shuttle für den Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen Zytosol und mitochondrialer Matrix, sowie die elektrophysiologische Kopplung zwischen dem zytosolischen und dem mitochondrialen Kompartiment. Mit dessen Hilfe interpretieren wir die gemessenen NAD(P)H-Fluoreszenzkurven unter Berücksichtigung bekannter metabolischen Parameter wie Metabolitkonzentrationen, Sauerstoff/Glukose-Index, Lactatprofilen und den Ergebnissen aus Kapitel 3.

Neben einer Vertiefung unseres Verständnisses über den Energiestoffwechsel intakter Neuronen, erlaubt ein kinetisches Modell Änderungen an Modellparametern vorzunehmen und die daraus resultierenden funktionalen Änderungen/Störungen zu untersuchen, und damit ein besseres Verständnis für das System auch in pathologischen Situationen zu erlangen. Ausgehend von der Beobachtung, dass in vielen altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, ein Rückgang der Aktivität des Enzymkomplexes  $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenase zusammen mit starken Funktionalitätsstörungen und massivem Zellsterben auftritt, haben wir in Kapitel 5 den Einfluss einer gestörten Aktivität der  $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenase (KGDHC) auf den neuronalen Energiestoffwechsel untersucht. Da eine mögliche/plausible Ursache für die reduzierte KGDHC-Aktivität in seiner Sensibilität gegenüber von der Atmungskette generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besteht, haben wir unser Modell der Atmungskette so erweitert, dass wir in der Lage waren, den Besetzungszustand möglicher ROS-erzeugender Reaktionszentren in den Atmungskettenkomplexen I und III in Abhängigkeit von der Aktivität der enzymatischen Ausstattung der Zelle zu simulieren. Die Resultate dieser Simulationen befinden sich in Kapitel 5.

Insgesamt spannt die Arbeit einen Bogen von den elektrophysiologischen Zwangsbedingungen, die sich aus dem Wechselspiel zwischen Funktionalität und

Zellintegrität ergeben, über die daraus resultierenden Zwangsbedingungen an den Metabolismus, die Quantifikation der metabolischen Leistungsfähigkeit über die Realisierung dieser metabolischen Funktionen in einem molekular aufgelösten kinetischen Netzwerk bis hin zur Untersuchung der Auswirkungen von Beeinträchtigungen dieser molekularen Architektur auf die ursprüngliche Funktionalität.

# Kapitel 1: Einfluss von Chlorid auf Aktionspotential-generierung und Volumenregulation von erregbaren Zellen

## 1.1 Einleitung

Das Membranpotential weist typischerweise einen Ruhewert von ungefähr  $-70$  mV auf. Aktionspotentiale (APs) sind Depolarisierungen des Membranpotentials auf bis zu  $40$  mV innerhalb weniger Millisekunden, gefolgt von einem gleichermaßen schnellen Abfall zurück zum Ruhewert. Während eines AP, werden spannungsgesteuerte Kanäle für kleine Ionen wie Natrium und Kalium auf koordinierte Weise geöffnet und geschlossen. Dadurch werden vorübergehende elektrische Ströme dieser Ionen entlang ihrer jeweiligen Gradienten ermöglicht: Natrium strömt in die Zelle ein, während Kalium die Zelle verlässt. Veränderungen der Membranspannung beeinflussen nicht nur die spannungsabhängigen Kanäle, sondern wirken sich auch auf die Größe der elektrodiffusiven Ionenströme durch passive nicht gesteuerte Kanäle aus. Das gilt insbesondere für Chlorid, welches in den meisten Zellen eine hohe basale Permeabilität aufweist. Veränderungen in den Strömen für Natrium, Kalium oder Chlorid die während eines APs auftreten, müssen durch aktiven Transport kompensiert werden. Wenn diese Kompensation nicht vollständig ist, bevor weitere APs ausgelöst werden, können Verschiebungen in den Transmembrangradienten der kleinen Ionenspezies akkumulieren.

Veränderungen in den Transmembrangradienten während Erregung können zu Volumenänderungen führen (Andrew and Macvicar, 1994; Ballanyi et al., 1990; Hill, 1950). Im Gehirn führt das Anschwellen von Neuronen zur Komprimierung des Interstitialraumes, was eine Erhöhung der externen Kaliumkonzentration zur Folge hat. Die daraus resultierende Depolarisierung des Membranpotentials reduziert die Reizschwelle und erhöht die Erregbarkeit, was im schlimmsten Fall Anfallsleiden, SD (Spreading Depression) oder HSD (hypoxic SD-like depolarization) auslöst (Andrew, 1991; Kager et al., 2007).

Hauptverantwortlich für die Regulation des Zellvolumens ist Chlorid (Jentsch, 1996), da Flüsse dieses negativen und diffusiblen Ions in der Lage sind schnell zusätzliche Anionenflüsse zu kompensieren. Zusätzlich spielt die basale Chloridpermeabilität eine wichtige Rolle bei der Erregbarkeit. In vielen erregbaren Zellen, und auch im nicht dendritischen Teil von Neuronen, wird die zelluläre Chloridkonzentration hauptsächlich durch die passiven Chloridströme bestimmt. was dazu führt, dass das Umkehrpotential für Chlorid sehr dicht beim zellulären Membranpotential liegt. Daher führt eine Depolarisation, die durch exzitatorische Kationenströme ausgelöst wird, zu Gegenströmen von Chlorid. Als Konsequenz daraus ergibt sich, dass die exzitatorischen Ströme, die notwendig sind, um das Öffnen von spannungsgesteuerten Natriumkanälen zu bewirken, bei einer größeren Chloridpermeabilität ansteigen müssen. Eine wichtige Ausnahme dieser allgemeinen Regel stellt die postsynaptische Membran von GABAergen Neuronen dar. Dort wird Chlorid aktiv transportiert und ist notwendig, um bei von Neurotransmittern ausgelöstem Öffnen von Chloridkanälen die Membran in den betroffenen Regionen entweder zu hyperpolarisieren (inhibitorische Synapse) oder zu depolarisieren (exzitatorische Synapse) (Coull et al., 2003; Kahle et al., 2008; Woo et al., 2002; Zhu et al., 2008).

In diesem Kapitel präsentieren wir eine detaillierte theoretische Untersuchung über den Einfluss von Chloridströmen auf die Volumenregulation und die Erregungsmuster von erregbaren Zellen. Unser Modell zur Simulation der zeitlichen Veränderungen in den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid verbindet Veränderungen in den Ionenkonzentrationen, mit Transmembranströmen, ausgelöst durch

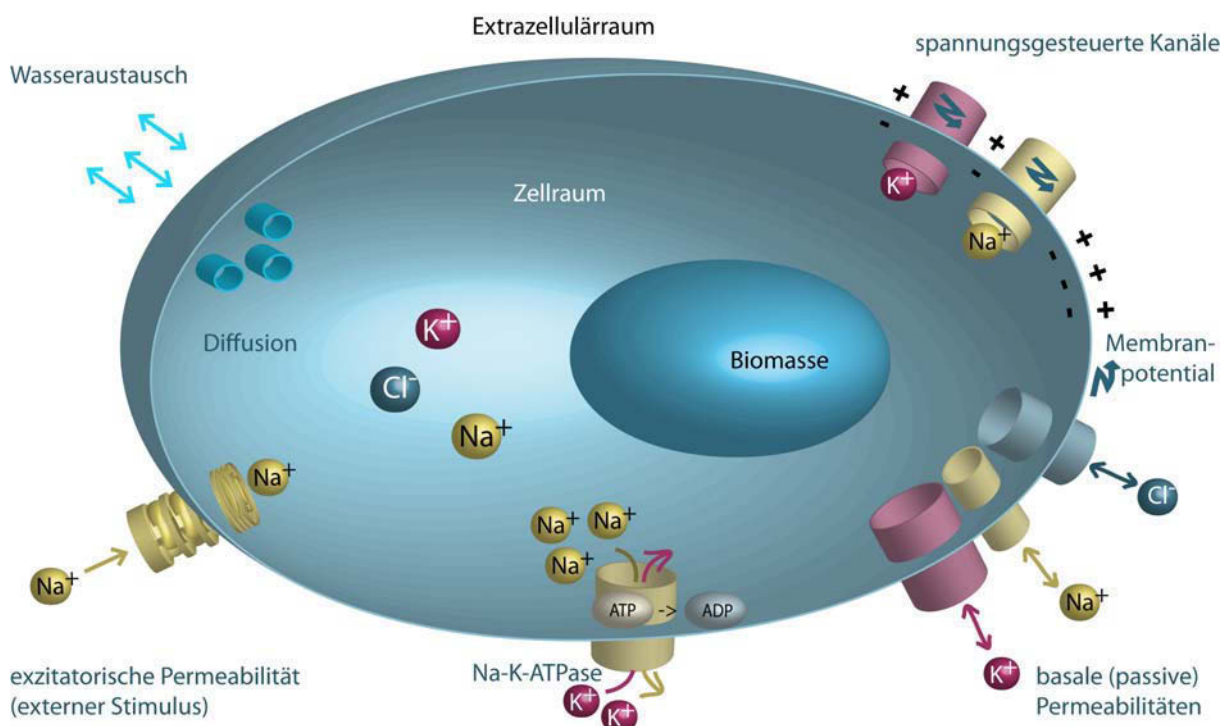


aktive Ionenpumpen, passive und spannungsgesteuerte Ionenkanäle sowie Membranpermeabilitäten. Die Simulationen geben beobachtete Volumenänderungen in neuronalen Zellen bei Aktivität, sowie Hypererregbarkeit von Muskelzellen, die die Ursache der neuromuskulären Krankheit myotonia congenita bilden, korrekt wieder. Wir sagen außerdem eine Reihe neuer, bisher experimentell noch nicht untersuchte Phänomene voraus, die eine Veränderung der passiven Chloridpermeabilität auf die Frequenz, Form und Dauer von Pulsfolgen (spike trains) hat. Aufgrund unserer Untersuchungen spekulieren wir, dass Veränderungen in der Chloridpermeabilität einen bis dato unterschätzten Mechanismus zur Adaption von neuronalen Responses auf exzitatorischen Stimuli darstellen.

## 1.2 Modellbeschreibung

Das Modell beschreibt die Dynamik der drei Ionenspezies Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ), und Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) in einer Modellzelle. Diese ist durch ihre sphärische Geometrie und die Dichten und kinetischen Eigenschaften verschiedener Kanaltypen und Ionenpumpen charakterisiert. Sie wird im Folgenden nur noch als Zelle bezeichnet.

Das Modell berücksichtigt drei verschiedenen Arten von Ionentransport über die Zellmembran: (i) passiver Ionentransport mittels nicht gesteuerter Ionenkanäle, (ii) passiver Ionentransport mittels spannungsgesteuerter Ionenkanälen und (iii) aktiver Transport von Natrium und Kalium durch die Na-K-ATPase (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Schematische Repräsentation der im Modell berücksichtigten Prozesse. Die Durchmesser der passiven Ionenkanäle repräsentiert die relative Ionenpermeabilitäten von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  (50:1:25). Erregung wird durch Erhöhung der exzitatorischen Permeabilität für  $\text{Na}^+$  erreicht, die das Öffnen von ligandengesteuerten Kanälen widerspiegelt. APs werden durch spannungsgesteuerte Kanäle für  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_{\text{gated}}$ ) und  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{gated}}$ ). Die Transmembrangradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  werden durch die Na-K-ATPase aufrechterhalten, die auch das auf der zytosolischen Seite negative Membranpotential generiert. Osmotischer Druckausgleich zwischen Extrazellulärraum und Zellraum erfolgt durch Wasseraustausch durch die Zellmembran. Der zytosolische Ladungsbeitrag aufgrund von nicht diffiblen organischen, zellulären Molekülen wird durch die Modellvariable „Biomasse“ berücksichtigt.

Die zeitabhängige Veränderung der Ionenkonzentrationen wird durch die folgenden kinetischen Gleichungen beschrieben:

$$\frac{d[X]_{cell}}{dt} = -\frac{I_X}{z_X F \Omega_{cell}} - \frac{[X]_{cell}}{\Omega_{cell}} \frac{d\Omega_{cell}}{dt}, \quad (1)$$

$$\frac{d[X]_{out}}{dt} = -\frac{I_X}{z_X F \Omega_{out}} - \frac{[X]_{out}}{\Omega_{out}} \frac{d\Omega_{out}}{dt}. \quad (2)$$

Hierbei ist  $F$  die Faradaykonstante,  $\Omega_{cell}$  und  $\Omega_{out}$  bezeichnen das Zellvolumen und das Volumen des Extrazellulärraums,  $z_X$  bezeichnet die Ladungszahl und  $I_X$  den Gesamttransmembranstrom der Ionenspezies  $X \in \{Na^+, K^+, Cl^-\}$ . Der Gesamttransmembranstrom setzt sich aus der Summe der passiven Ionenströme (d. h. Ströme getrieben durch Elektrodifusion)  $I_X^p$  und den aktiven Strömen  $I_X^a$ , die durch aktiven Ionentransport bewerkstelligt werden, zusammen:

$$I_X = I_X^a + I_X^p. \quad (3)$$

Die passiven Ionenströme  $I_X^p$  werden durch eine Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschrieben,

$$I_X^p = A \Pi_X U F z_X^2 \frac{[X]_{cell} \exp(z_X U) - [X]_{out}}{1 - \exp(z_X U)}, \quad (4)$$

wobei  $A$  die Membranoberfläche,  $U = \frac{FV}{RT}$  und  $\Pi_X$  die totale Membranpermeabilität für die Ionenspezies  $X$ , die durch alle passiven Ionentransportprozesse zustande kommt, beschreibt. Wir zerlegen die totale Membranpermeabilität in drei additive Anteile:

$$\Pi_X = P_X^0 + P_X^g + \Delta P_X. \quad (5)$$

$P_X^0$  bezeichnet die basale Permeabilität der Ionenspezies  $X$ , die sich aus allen möglichen passiven Membranprozessen mit Ausnahme von spannungsgesteuerten Kanälen zusammensetzt.  $P_X^0$  enthält daher auch die Permeabilität, die aufgrund von ionengekoppeltem Substrattransport, z. B. Neurotransmitter-Uptake, entsteht.  $P_X^g$  ist die zeit- und membranpotentialabhängige Permeabilität von gesteuerten Ionenkanälen für die Ionenspezies  $X$ . Unser Modell beinhaltet spannungsgesteuerte Kanäle für  $Na^+$  und  $K^+$ , die in derselben Art und Weise wie im Standardmodell von Hodgkin und Huxley (Hodgkin and Huxley, 1952) beschrieben werden:

$$P_K^g = m^4 P_K^{g0}, \quad (6)$$

$$P_{Na}^g = m^4 P_{Na}^{g0}. \quad (7)$$

Die Steuerungsvariablen  $g \in \{h, m, n\}$  gehorchen gewöhnlichen Differentialgleichungen

$$\frac{dg}{dt} = C_g (\alpha_g (1 - g) + \beta_g). \quad (8)$$

$C_g$  ist eine Konstante,  $\alpha_g$  und  $\beta_g$  repräsentieren membranpotentialabhängige Funktionen, die für jede Ionenspezies und jeden Kanaltyp einzeln betrachtet werden müssen (siehe Anhang). Der dritte Term in Gl. 5,  $\Delta P_X$ , trägt Veränderungen in der Membranpermeabilität für die Ionenspezies  $X$  aufgrund des Öffnens von ligandengesteuerten Kanälen Rechnung. Der aktive Transport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wird durch die Na-K-ATPase bewerkstelligt. Die Standardratengleichung für die Na-K-ATPase lautet:

$$I_{K-ATPase}^a = 2F \frac{k_{NaK}}{\left(1 + \frac{Na_c}{[Na^+]_{cell}}\right)^n}, \quad (9)$$

$$I_{Na-ATPase}^a = -3F \frac{k_{NaK}}{\left(1 + \frac{Na_c}{[Na^+]_{cell}}\right)^n}, \quad (10)$$

wobei angenommen wird, dass die Pumpe stets mit ATP gesättigt ist (die Michaelis-Menten-Konstante für ATP liegt bei 300–500  $\mu\text{M}$  (Therien and Blostein, 2000) und damit weit unterhalb des zellulären ATP-Spiegels). Der regulatorische Einfluss von  $[K^+]_{out}$  wird vernachlässigt und die Abhängigkeit von  $[Na^+]_{cell}$  wird durch eine sigmoidale Funktion mit  $n > 1$  berücksichtigt. Der Parameter  $k_{NaK}$  beschreibt die maximale Pumprate und  $Na_c$  die Halbsättigungskonstante von  $\text{Na}^+$ .

Um das Membranpotential mit den Transmembranströmen in Verbindung zu setzen, behandeln wird die Membran als Kondensator mit Gesamtkapazität  $C$ . Diese ist durch

$$C = c_m A = \frac{Q}{V}, \quad (11)$$

gegeben, wobei  $Q$  die Gesamtladung auf dem Kondensator,  $V$  das durch die Gesamtladung generierte Membranpotential und  $c_m$  die spezifische Membrankapazität der Zelloberfläche  $A$  ist. Wir nehmen an, dass Faltung und Entfaltung der Zellmembran dafür sorgen, dass die Zelloberfläche  $A$  während maßvoller Volumenänderungen konstant bleibt. Differenzieren von Gl. 11 nach der Zeit gibt dann

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C} \frac{dQ}{dt} - \frac{Q}{C^2} \frac{dC}{dt}. \quad (12)$$

Unter der Annahme, dass zeitliche Variationen der Membrankapazität vernachlässigbar sind, d.h., dass  $\frac{dC}{dt} = 0$  gilt, erhält man:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C} \sum_X \frac{dQ_X}{dt} = \frac{1}{C} \sum_X I_X. \quad (13)$$

Letztendlich müssen wir noch die zellulären Volumenänderungen mit den internen und externen Ionenkonzentrationen verknüpfen. Osmotischer Druck entsteht durch Unterschiede in den internen und externen Osmolaritäten,  $O_{in}$  und  $O_{out}$ . Er wird durch schnellen Austausch von Wasser über die Zellmembran ausgeglichen und führt somit zu Volumenänderungen:

$$\frac{d\Omega_c}{dt} = P_w (O_{in} - O_{out}), \quad (14)$$

$$O_{in} = \sum_X (z_X [X]_{cell}) + [B], \quad (15)$$

$$O_{out} = \sum_X (z_X [X]_{out}), \quad (16)$$

$$\frac{d\Omega_{out}}{dt} = -\frac{d\Omega_c}{dt}. \quad (17)$$

$P_w$  beschreibt die Wasserpermeabilität und  $[B]$  steht für den Beitrag der nicht diffusiblen aber osmotisch aktiven Moleküle (der zellulären Biomasse) zur Gesamtosmolarität im Zellinneren.

Alle Parameter, eine Kurzbeschreibung ihrer Bedeutung, die numerischen Werte, die in den Simulationen verwendet wurden und die Quellen befinden sich im Anhang. Die Parameterwerte wurden fast alle der Literatur entnommen, lediglich die Aktivität der Na-K-ATPase wurde so angepasst, dass sich unter Ruhebedingungen ( $\Delta P_X = 0$  in Gl. 5) typische Werte für die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen das Membranpotential einstellen. Für die Integration der Differentialgleichungen wurde die MATLAB Software 6.5.1.199709 (R13) Service Pack 1 benutzt.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Die Rolle von Chlorid bei der Regulation des Zellvolumens

#### 1.3.1.1 Volumenregulation in nicht erregbaren Zellen

Um die allgemeine Rolle von Chlorid bei der Volumenregulation von Zellen zu illustrieren, wendeten wir unser Modell zuerst auf nicht erregbare Zellen an. Das wird dadurch erreicht wird, dass wir die Permeabilitäten für die spannungsgesteuerten Kanäle auf Null setzen,  $P_K^{g0} = P_{Na}^{g0} = 0$ . Mit dieser Einschränkung beinhaltet unser Modell dieselben Membranprozesse wie das Modell, das Armstrong (Armstrong, 2003) vorgeschlagen hat um die Einflüsse der Na-K-ATPase und Chlorid auf die osmotische Stabilität von Zellen zu untersuchen. Es muss jedoch angemerkt werden, dass unser Modell zeitliche Veränderungen des Membranpotentials einschließt, während im Armstrongmodell die nichtadäquate Gleichgewichtsannahme  $\frac{dV}{dt} = 0$  gemacht wurde.

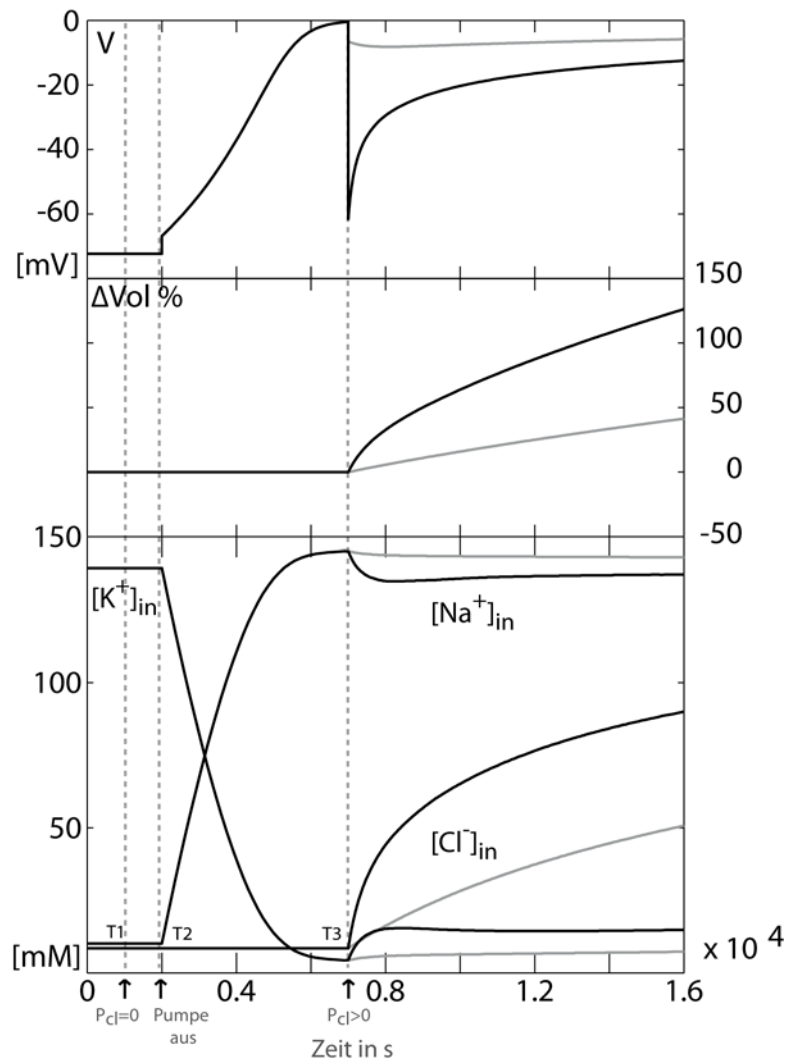
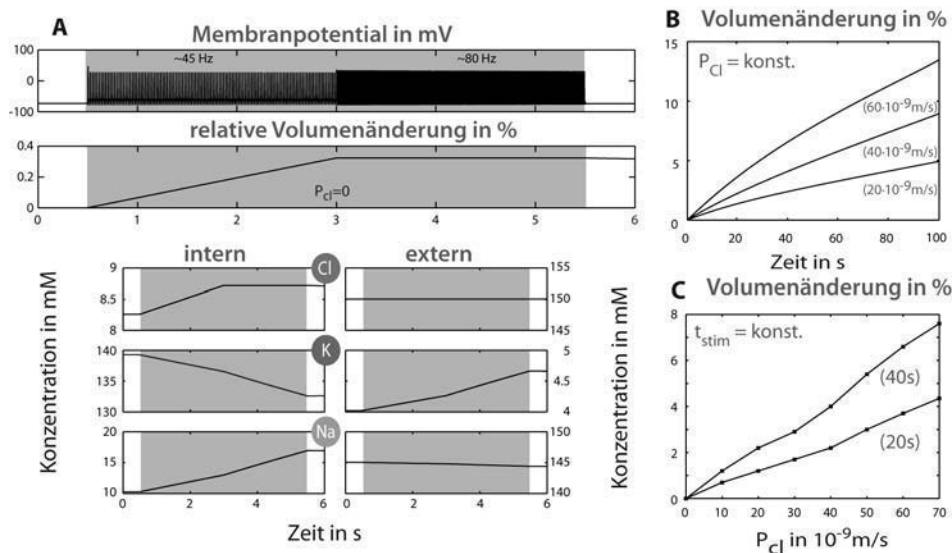


Abbildung 1.2: Simulierte zeitliche Verläufe der Ionenkonzentrationen, Volumenänderungen und des Membranpotentials bei verschiedenen Chloridpermeabilitäten. Die Permeabilität der spannungsgesteuerten Kanäle wurde auf null gesetzt (entspricht einer nicht erregbaren Zelle). Da Chlorid nur passiv ausgetauscht wird, verschwindet der Chloridstrom im stationären Zustand, d. h. das Blockieren der passiven Chloridpermeabilität (beim Zeitpunkt T1) hat keinen Effekt auf die Chloridkonzentration. Abschalten der Na-K-ATPase (zum Zeitpunkt T2) verursacht eine sprunghafte Depolarisation des Membranpotentials, ausgelöst durch das Anhalten des auswärtsgerichteten positiven Ladungsstroms durch Hemmung der elektrogene Pumpe. Im Folgenden wird die Membran weiter depolarisiert und es findet ein massiver Austausch von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  statt, wobei das Zellvolumen jedoch unverändert bleibt. Das Lösen der Blockade der Chloridpermeabilität (zum Zeitpunkt T3) führt zu einem Einstrom von  $\text{Cl}^-$  und einer kontinuierlichen Zellschwellung, die so lange weitergeht, bis die Zelle platzt. Die Volumenänderungen sind weniger ausgeprägt, wenn die anfängliche Chloridpermeabilität nur teilweise wieder hergestellt wird (siehe transparente Kurve), d. h. die Schwellrate hängt vom Absolutwert der Chloridpermeabilität ab.

Abbildung 1.2 verdeutlicht die Wichtigkeit der Chloridströme für die zelluläre Volumenänderung beim Abschalten der Na-K-ATPase. Bei blockierten Chloridkanälen können nur positive Ionen in die Zelle eindringen. Das führt zu einer Depolarisierung der Membran, was weitere positive Ionen daran hindert in die Zelle zu gelangen. Aufgrund der niedrigen spezifischen Kapazität werden nur sehr wenige Ionen für die Membrandepolarisation benötigt. Daher sind die Änderungen der internen Osmolarität und die damit einhergehende zelluläre Volumenänderung vernachlässigbar klein. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem massiven Einstrom sich gegenseitig kompensierender positiver und negativer Ladungen, wenn Chlorideinstrom zugelassen wird. Obwohl dann der

Nettoladungsfluss über die Membran sehr klein ist, ist der osmotische Strom groß, was zum Anschwellen der Zelle führt. Die Schwellrate erhöht sich mit größerer Chloridpermeabilität. Die Tatsache, dass eine Verminderung der Chloridpermeabilität die Zellschwellung hemmt, hat zu experimentellen Studien mit Chloridtransportinhibitoren geführt, um die Effekte von osmotischen Zellschwellungen in Neuronen bei Ischämie-induzierter Energieverarmung zu lindern (Muller, 2000).

### 1.3.1.2 Volumenregulation in erregbaren Zellen



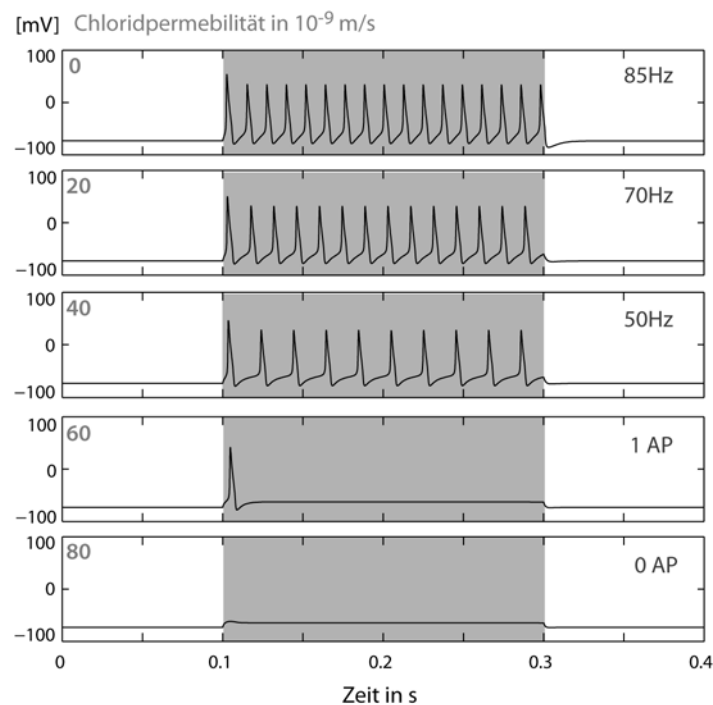
**Abbildung 1.3:** Simulierte Zeitverläufe der Ionenkonzentrationen, Volumenänderungen und Feuermuster einer erregbaren Zelle bei verschiedenen Chloridpermeabilitäten. Zwischen  $t = 0,5 \text{ s}$  und  $t = 5,5 \text{ s}$  (= 5 s Erregungszeitraum) wurde die Natriumpermeabilität vom ihrem Ruhewert  $8 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{s}}$  auf  $10,32 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{s}}$  gesetzt, so dass APs ausgelöst wurden. Das Volumenverhältnis zwischen Extra- und Intrazellulärraum wurde auf 10 gesetzt, was nur zu moderaten Anstiegen der externen Ionenkonzentrationen führt. Nach 2,5 s Erregung (bei  $t = 3$ ) wurde die passive Chloridpermeabilität auf null gesetzt. Die grau hinterlegten Bereiche kennzeichnen die Zeiträume in denen die exzitatorische Natriumpermeabilität ungleich null war. (A) Der exzitatorische Natriumstrom löste AP mit einer Frequenz von  $\sim 45 \text{ Hz}$  aus. Innerhalb von 2,5 s Erregung erhöhte sich das Zellvolumen um 0,4 %. Das Blockieren der passiven Chloridpermeabilität stoppte die Zellschwellung und erhöhte die Feuerrate auf  $\sim 80 \text{ Hz}$ . Das AP-Feuern wurde von einer kontinuierlichen Verschiebung in den internen und externen Ionenkonzentrationen begleitet. (B) zeigt die Abhängigkeit der Volumenveränderung von der Dauer der Erregung bei verschiedenen Chloridpermeabilitäten. (C) Volumenänderungen nach 20 und 40 s Erregung als Funktion der passiven Chloridpermeabilität. Die numerischen Werte der Modellparameter finden sich in Anhang.

Als nächstes simulierten wir die Volumenänderungen in erregbaren Zellen bei verschiedenen Größen der basalen Chloridpermeabilität. Erregung wurde dadurch erreicht, dass für die angegebenen Zeiträume die Permeabilität der exzitatorischen Natriumkanäle erhöht wurde. Während der Erregung ist das mittlere Membranpotential weniger negativ als in Ruhe. Daher gelangen mehr Chloridionen in die Zelle und das Zellvolumen wächst an (siehe Abbildung 1.3 A). Die Simulationsergebnisse in Abbildung 1.3 B und 1.3 C verdeutlichen, dass die Volumenänderungen während Erregung von der Größe der basalen Chloridpermeabilität (die die Größe des einwärts gerichteten Chloridstroms bestimmt) abhängt. Unsere Simulationen legen nahe, dass die passive Chloridpermeabilität hinreichend niedrig sein muss, um signifikante Volumenänderungen während des Feuerns von APs zu vermeiden. Bei einer basalen Chloridpermeabilität von  $40 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{s}}$  wird eine Volumenänderung von 5 % in weniger

als einer Minute erreicht (Abb. 3B). Wenn man bedenkt, dass der Extrazellulärraum in neuronalem Gewebe lediglich 20 % ausmacht (Sykova, 2005), führt ein Volumenzuwachs von 5 % in Neuronen zu einer Kompression des Extrazellulärraums von 25 %, was zu einem gleichgroßen Anstieg der extrazellulären Ionenkonzentrationen, insbesondere Kalium führt. Das kann zu Anfallsleiden ähnlichen Erscheinungen führen (Andrew, 1991; Andrew and Macvicar, 1994).

### 1.3.1.3 Der Einfluss von Chloridströmen auf die Charakteristiken von Pulsfolgen (spike trains)

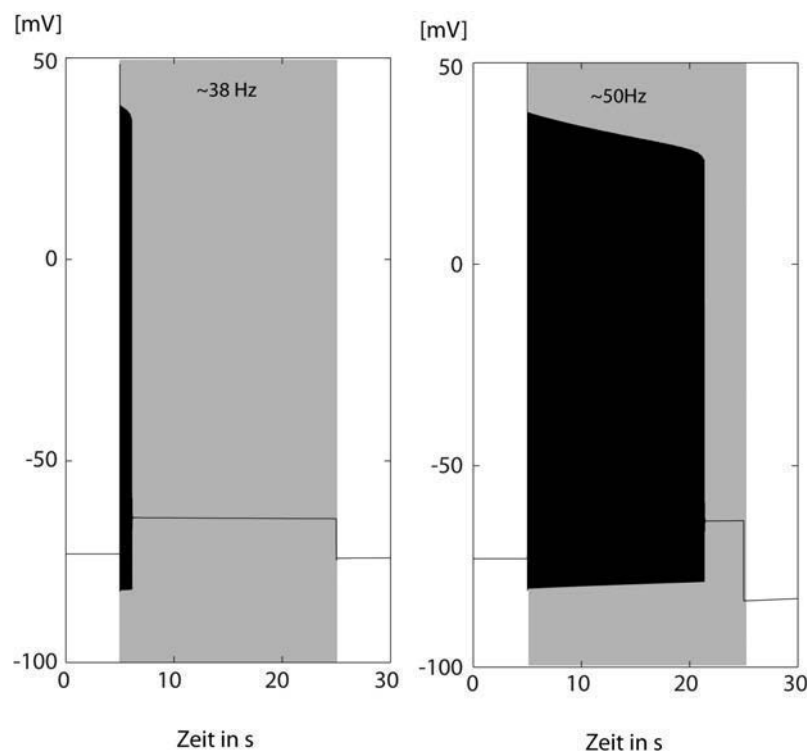
Um den Einfluss der basalen Chloridpermeabilität auf die Frequenz und die Dauer von AP Pulsfolgen zu untersuchen, führten wir Simulationen durch, in denen wir die passive Chloridpermeabilität zwischen Null und dem doppelten ihres Referenzwert variierten. Mit höherer passiver Chloridpermeabilität veränderte sich die Frequenz der APs dramatisch (siehe Abbildung 1.4). Bei Chloridpermeabilitäten unterhalb des Referenzwertes, erhöhte sich die AP Frequenz um mehr als 50 %, während bei 1,5-fach erhöhter basaler Chloridpermeabilität nur noch ein einziges AP ausgelöst wurde. Bei der doppelten Chloridpermeabilität wurde gar kein AP mehr ausgelöst.



**Abbildung 1.4:** Einfluss der passiven Chloridpermeabilität auf das Feuermuster. Die exzitatorische Natriumpermeabilität wurde für 0,2 s (= Dauer der Erregung, grau hinterlegt) auf den konstanten Wert  $2,5 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  gesetzt. Die basale Chloridpermeabilität wurde in fünf Schritten zwischen 0 und  $80 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  variiert (siehe obere linke Ecken). Durch Erhöhen der Chloridpermeabilität wird die Frequenz der AP kontinuierlich vermindert bis bei  $80 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  schließlich keine mehr ausgelöst werden.

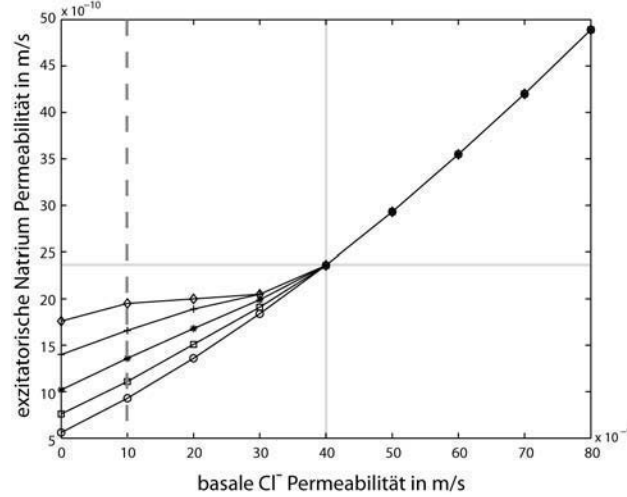
Diese erstaunliche Abhängigkeit des AP-Feuerns von der basalen Chloridpermeabilität kann man sich folgendermaßen erklären: Die anfängliche Depolarisation der Membran führt zu einem einwärtsgerichteten Chloridstrom, der dem exzitatorischen Natriumstrom entgegen wirkt. Eine höhere Chloridpermeabilität macht also einen höheren exzitatorischen Natriumstrom erforderlich, um eine Depolarisation zu erreichen, die ausreichend ist um die

spannungsgesteuerten Natriumkanäle zu öffnen. Da der Natriumgradient während Erregung stetig kleiner wird, fällt der exzitatorische Natriumstrom letztendlich unter den für die Aufrechterhaltung der Erregung notwendigen Grenzwert. Umso höher also die basale Chloridpermeabilität ist, desto höher muss auch der exzitatorische Natriumstrom sein, und umso länger ist der Zeitraum in dem der  $\text{Na}^+$ -Gradient ausreicht, um die Erregung aufrecht zu erhalten. Die Situation ist in Abbildung 1.5 dargestellt, wo die exzitatorische Natriumpermeabilität für 20 s (entspricht der Erregungsdauer) bei einer passiven Chloridpermeabilität von  $10 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{s}}$  einmal um 1 % und einmal um 66 % über dem zur Auslösung von APs notwendigen Minimalwert gesetzt wurde. Es ist klar erkennbar, dass die Feuerdauer der APs sich mit höherer exzitatorischer Natriumpermeabilität verlängert. Trotzdem hörte auch bei einer im Vergleich zum Minimalwert 1,66-fach erhöhten exzitatorischen Natriumpermeabilität das AP-Feuern vorzeitig auf. Mit anderen Worten: Damit eine erregbare Zelle eine vorgeschriebene Zeitdauer feuert, ist die Erregungspermeabilität (soll heißen die notwendige exzitatorische Natriumpermeabilität) vom Absolutwert der basalen Chloridpermeabilität abhängig (siehe Abbildung 1.6). Erstaunlicherweise hängt unterhalb von einem Schwellwert der Chloridpermeabilität von  $40 \cdot 10^{-8} \frac{\text{m}}{\text{s}}$  die notwendige exzitatorische Natriumpermeabilität von der Dauer der Erregung ab, während sie oberhalb des Schwellwertes unabhängig von der AP Feuerdauer wird. Zusammenfassend zeigen diese Simulationen, dass eine hohe basale Chloridpermeabilität das AP-Feuern stabilisiert.

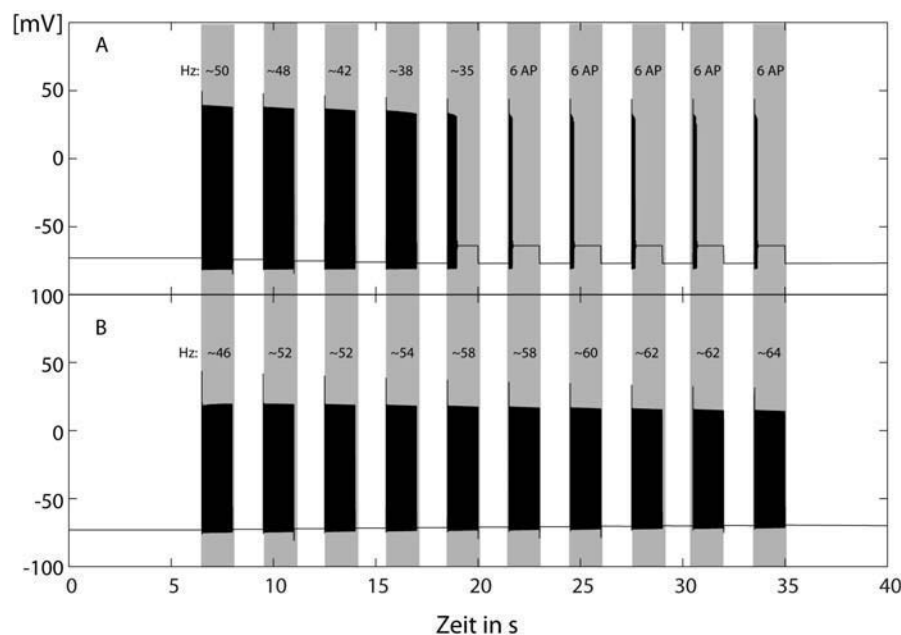


**Abbildung 1.5:** Abhängigkeit der Feuerdauer von der Erregungsstärke. Die exzitatorische Natriumpermeabilität wurde für 20 s (= Dauer der Erregung, grau hinterlegt) einmal auf den 1,01 und einmal auf den 1,66-fachen Wert der Reizschwelle gesetzt. Der Wert der basalen Chloridpermeabilität betrug  $10 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{s}}$ . Die Feuerdauer der AP verlängerte sich mit höherer Erregungsstärke. Nicht einmal eine 66 % über dem Schwellwert liegende Erregungsstärke war ausreichend um Feuern für die gesamten 20 s zu gewährleisten. Das Volumenverhältnis zwischen Zell- und Extrazellulärraum wurde auf 100 gesetzt, was lediglich zu kleinen Veränderungen in den externen Ionenkonzentrationen führt.





**Abbildung 1.6:** Die basale Chloridpermeabilität bestimmt die minimale exzitatorische Natriumpermeabilität, die erforderlich ist, um eine vorgegebene AP-Feuerdauer zu erreichen. Die durchgezogenen Linien zeigen das erforderliche Verhältnis zwischen der basalen Chloridpermeabilität und der minimalen exzitatorischen Natriumpermeabilität, um AP-Feuern für mindestens 1 s (leere Kreise), 5 s (leere Quadrate), 10 s (Sterne), 20 s (Kreuze), oder 40 s (Raute) zu ermöglichen. Die Beziehung zwischen der basalen Chloridpermeabilität und der minimalen exzitatorischen Natriumpermeabilität ist monoton. Erstaunlicherweise wird die minimale exzitatorische Natriumpermeabilität unabhängig von der Erregungsdauer, wenn die basale Chloridpermeabilität den Grenzwert  $40 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  übersteigt. Unterhalb dieses Wertes hängt die AP-Feuerdauer von der Erregungsstärke ab.



**Abbildung 1.7:** Feuerresponse einer erregbaren Zelle auf einen wiederholten Stimulus konstanter Stärke. Die Erregungsstärke war ausreichen um ausgehend vom Ruhezustand 6 s zu feuern. Jeder Stimulus hatte eine Dauer von 1,5 s und folgte auf den vorhergehenden mit einem Abstand von ebenfalls 1,5 s. (A) zeigt die Response einer erregbaren Zelle mit einer geringen Chloridpermeabilität von  $10 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$ . Die Feuerfrequenz nahm bei aufeinanderfolgenden Reizperioden ab. Der Stimulus war nicht ausreichend um APs über die gesamte Erregungszeit zu generieren. (B) zeigt die Response einer erregbaren Zelle mit einer hohen Chloridpermeabilität von  $60 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$ . Die Feuerfrequenz nahm aufgrund von intern akkumulierendem Chlorid und extern akkumulierendem Kalium stetig zu.

Eine erstaunliche Konsequenz dieser Simulationsergebnisse besteht darin, dass eine niedrige Chloridpermeabilität erregbaren Zellen insofern eine Art Kurzzeitgedächtnis verleiht, als sich ihre Response auf eine Serie gleichartiger Erregungsreize verändert (Abbildung 1.7 A). Abhängig von der Anzahl der vorangegangenen Stimuli und dem zeitlichen Abstand zwischen

diesen, kann die AP-Feuerdauer deutlich kürzer ausfallen. Solch ein Feuerverhalten kann man als nicht-Markovsch bezeichnen, da die Response der erregbaren Zelle von ihrer Vorgeschichte abhängt. Im Gegensatz dazu erfordert eine hohe basale Chloridpermeabilität einen hohen exzitatorischen Strom (siehe oben) und ermöglicht damit eine markovsche Response, d. h. praktisch eine 1:1-Übersetzung repetitiver Erregungen in spike trains (Abbildung 1.7 B).

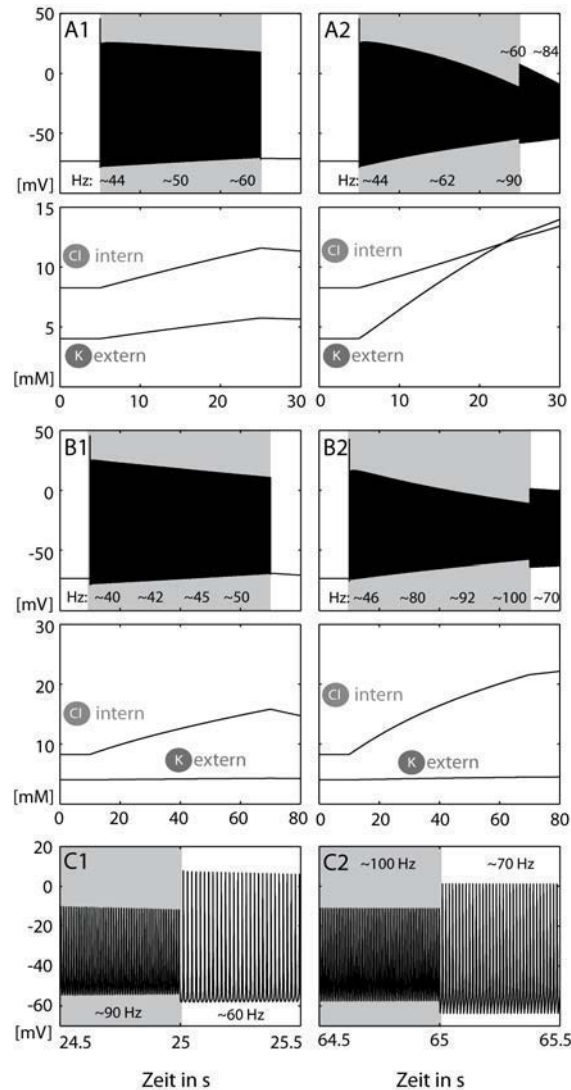


Abbildung 1.8: Verschiedene Arten von Nachentladungen (after-discharge). (A) Kalium induzierte Nachentladungen, ausgelöst durch eine Verkleinerung des Verhältnisses von Zell- zu Extrazellulärraum von 1:10 (A1) auf 1:2 (A2). Die Dauer der Erregung (grau hinterlegt) betrug 20 s. Aufgrund der externen Akkumulation von Kalium nahm die Frequenz stetig zu. Am Ende der Erregung war die externe Kaliumakkumulation in A2 groß genug, um Nachentladungen auszulösen. (B) Chlorid-induzierte Nachentladungen ausgelöst durch Erhöhen der basalen Chloridpermeabilität von  $40 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  (B1) auf  $70 \cdot 10^{-9} \frac{m}{s}$  (B2), während alle anderen Modellparameter unverändert blieben. Um den Einfluss von externem Kalium auszuschließen, wurde das Volumenverhältnis von Zell- zu Extrazellulärraum auf 1:1000 gesetzt. Die Dauer der Erregung (grau hinterlegt) betrug 60 s. Aufgrund der internen Chloridakkumulation nahm die AP-Frequenz stetig zu. Am Ende der Erregungsdauer war die interne Chloridakkumulation in B2 groß genug, um Nachentladungen auszulösen. Die jeweiligen Zeitverläufe der internen Chlorid- und externen Kaliumkonzentration sind in den Panels unter den Potentialverläufen aufgetragen. (C) Panel C1 zeigt die Potentialverläufe von A2 in der Umgebung des Zeitpunktes an dem der Stimulus aufhört. Durch das plötzliche Vermindern der exzitatorischen Natriumpermeabilität, erhöht sich die AP-Frequenz schlagartig. Jedoch ist die externe Kaliumkonzentration groß genug,

**Nachentladungen auszulösen. Panel C2 zeigt dieselbe Situation für die Chlorid-induzierte Nachentladung in B2.**

Unsere Simulationen zeigen auch, dass eine hohe Chloridpermeabilität nicht nur das AP-Feuern stabilisiert, sondern selber auch eine Gefahr für die Zelle darstellen kann, nicht nur durch Zellschwellen, sondern auch durch Chlorid induzierte Nachentladungen (Abbildung 1.8 B2). Während des Feuerns von APs sammelt sich intrazelluläres Chlorid an, da während der Depolarisationsphase mehr Chlorid in die Zelle einströmt, als sie in der Hyperpolarisationsphase wieder verlässt. Die Gesamtmenge des akkumulierten Chlorids hängt vom absoluten Wert der passiven Chloridpermeabilität ab. Wenn die Erregung aufhört, strömt Chlorid aus der Zelle aus und senkt dabei die Erregungsschwelle ab (ausströmendes Chlorid hat denselben Effekt wie einströmendes Natrium). Die daraus resultierende Chlorid-Nachentladung unterscheidet sich grundsätzlich von der bekannten Kalium-induzierten Nachentladung in Neuronen, die durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration ausgelöst wird (siehe Abbildung 1.8 A2). Während letztere das Resultat eines kollektiven Beitrags von gleichzeitig aktiven Neuronen ist und stark von der Fähigkeit benachbarter Gliazellen abhängt, überschüssiges Kalium aus dem Extrazellulärraum zu entfernen (Frohlich et al., 2008), ist die von unseren Simulationen in Abbildung 1.8 B2 vorhergesagte Chlorid-induzierte Nachentladung eine intrinsische Eigenschaft einer einzelnen erregbaren Zelle.

## 1.4 Diskussion

Jedes AP wird von vorübergehenden Verschiebungen in den Transmembran- ionenkonzentrationen begleitet. Wenn diese zwischen aufeinander folgenden APs nur unvollständig zurückgestellt werden können, sind Zellschwellung und Veränderungen in den Frequenzen und Formen der AP die Folge. Solche Veränderungen kompromittieren die Fähigkeit erregbarer Zellen, definiert und reproduzierbar auf eingehende elektrische oder humorale Stimuli zu reagieren. Um dieses Problem näher zu untersuchen, haben wir ein mathematisches Modell entworfen, das es ermöglicht, den Einfluss verschiedener Prozesse auf die Reproduzierbarkeit von langandauernden spike trains bei konstanter Erregung zu untersuchen. Hierbei haben wir uns auf die Rolle von Chlorid bei der osmotischen Regulation des Zellvolumens und des AP-Feuern konzentriert.

Genau wie in nicht erregbaren Zellen (siehe Abbildung 1.2), werden auch in erregbaren Zellen, die Volumenänderungen durch passive Chloridströme verursacht (siehe Abbildung 1.3). Unsere Simulation legen nahe, dass sich unter normalen physiologischen Bedingungen die durch Erregung induzierten Volumenänderungen in der Größenordnung von wenigen Prozenten bewegen. Für neuronale Zellen wurden solche Veränderungen experimentell bestätigt (Darquie et al., 2001). Signifikante Volumenänderungen könne allerdings bei lang anhaltendem Ansteigen in der Intensität von fortwährender neuronaler Aktivität, die sich in erhöhten Gammafrequenz-EEG-Spektren darstellt, beobachtet werden (Olsson et al., 2006). Erregungsinduziertes massives Ansteigen von intrazellulärem Chlorid wurde auch für die Neurotoxizität von Aminosäuren, wie Glutamat, N-Methyl-O-Aspartaten und Kainaten verantwortlich gemacht (Rothman, 1985).

Ein weiterer interessanter Effekt von erregungsinduzierten passiven Chloridströmen liegt in ihrem Einfluss auf die Frequenzmodulation und die Langlebigkeit von spike trains. Unsere Simulationen legen nahe, dass bei Chloridpermeabilitäten unterhalb eines Schwellwertes und für niedrige Erregungsströme die Feuerdauer der APs von der Stärke der exzitatorischen Natriumströme abhängt. Diese Situation trifft wahrscheinlich auf Neuronen zu. Wenn andererseits die basale Chloridpermeabilität doppelt so hoch wie die Kaliumpermeabilität ist oder sogar noch höher, eine Situation die im Muskel vorliegt (Hodgkin and Horowicz, 1959), werden so hohe exzitatorische Natriumströme für die erste Auslösung von APs erforderlich,

dass diese, so sie erst einmal in Gang gesetzt wurden, von dem während der Erregung abnehmenden Natriumgradienten nicht genug geschwächt werden, um nicht weiter APs auszulösen. Interessanterweise führt eine veränderte Chloridpermeabilität in Muskelzellen, in denen etwa 2/3 der gesamten Dämpfung der Membrandepolarisation durch passive Ionenpermeabilitäten auf Chlorid entfallen, zu Myotonie (Koch et al., 1992). Bei dieser neuromuskulären Erkrankung ist die Chloridpermeabilität des Sarkolemm des Skelettmuskels aufgrund einer Mutation des Chloridkanals CIC-1, der normalerweise eine hohe Chloridpermeabilität besitzt und somit das Ruhemembranpotential stabilisiert, stark verringert. Die Verringerung der Permeabilität dieses mutierten Kanals führt zu Hypererregbarkeit der Membran und verändertem Feuermustern (Adrian and Bryant, 1974; Jentsch, 1996). Die geringere basale Chloridpermeabilität von Neuronen im Vergleich zu Muskelzellen kann auf den geringeren extrazellulären Raum zurückgeführt werden. Da eine höhere basale Chloridpermeabilität zu einer höheren Schwellrate führt (Abbildung 1.3), mag die geringere Chloridpermeabilität notwendig sein, um ein Zusammendrücken des Interstitialraumes und die damit einhergehende Gefahr einer spreading depression zu vermeiden (Andrew, 1991).

Die Ergebnisse unserer Modellsimulationen, dass Variationen in den passiven Chloridpermeabilitäten von erregbaren Zellen einen starken Einfluss auf die Dauer, Frequenz und Reproduzierbarkeit von spike trains haben, sind auch für neuronale Netzwerke von Bedeutung. Zum Beispiel haben Neuronen mit einer sehr geringen Chloridpermeabilität eine vergleichsweise geringe Erregungsschwelle, aber ihre Feuerdauer hängt von der Erregungsstärke ab. Daher führen wiederholte Stimuli von gleicher Dauer und Stärke zu spike trains mit zunehmend kleiner werdender Amplitude und Feuerdauer (Abbildung 1.7). Die Response eines solchen Neurons hängt also von seiner Vorgeschichte ab. Das entspricht einem Kurzzeitgedächtnis und wird normalerweise als nicht-Markovsch bezeichnet. Im Gegensatz dazu würden Neuronen mit einer hohen basalen Chloridpermeabilität einen solchen Gedächtniseffekt nicht zeigen, sondern auf wiederholte identische Stimuli fast identisch reagieren.

Das Hauptziel dieser Studie war, die Einflüsse von Variationen im Wechselspiel der basalen Permeabilitäten, Ionenkonzentrationen und aktiven Ionentransporte auf die Stabilität und Charakteristik von spike trains und der Regulation des Zellvolumens während Erregung zu untersuchen. Unser Ziel war es, eher prinzipielle Mechanismen und Funktionsweisen aufzuzeigen, anstatt die detailliertesten Simulationen realer Zellen durchzuführen. Dementsprechend benutzten wir ein konzeptionelles Modell, das die große Zahl von verschiedener in der Literatur beschriebenen Kanäle und Transporter für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in wenige summarische Prozesse zusammenfasst. Unsere Simulationen haben gezeigt, dass die zeitlichen Veränderungen in den Transmembranverteilungen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  während Erregung, und die damit einhergehenden Veränderungen des zellulären Volumens und der Charakteristiken von spike trains, intrinsisch mit der Grundarchitektur des AP-generierenden Membransystems verbunden sind, und daher unabhängig von der Komplexität und der speziell gewählten Parametrisierung des mathematischen Modells auftreten. Veränderungen in den kinetischen Eigenschaften von Kanälen und Pumpen, sowie das hinzunehmen anderer Ionensorten oder Kanaltypen kann sich lediglich auf den Grad dieser Einflüsse auswirken.

# Kapitel 2: Evolutionäres Design und Robustheit neuronaler Zellen am Beispiel von Leckströmen

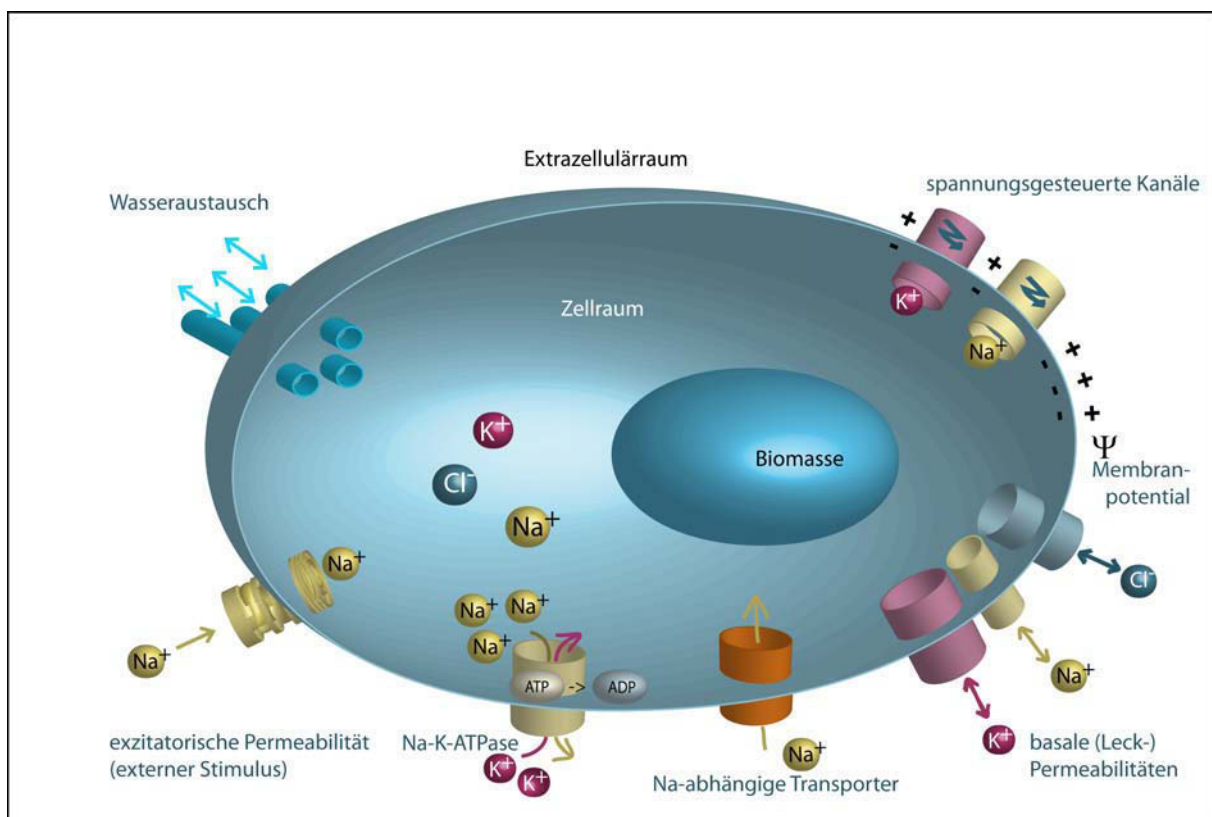
## 2.1 Einleitung

Obwohl das Gehirn nur 2% des Gesamtkörpergewichtes ausmacht, erhält es 15% des Herzminutenvolumens und ist verantwortlich für 20% des gesamten Sauerstoffverbrauchs sowie 25% des gesamten Glukoseverbrauchs des Körpers. Mehr als 90% der verbrauchten Glukose werden von Neuronen und Gliazellen verwendet, um ATP mittels der oxidativer Phosphorylierung zu erzeugen. Ungefähr 2/3 der gesamten ATP Produktion wird von der membranständigen Ionenpumpe Na-K-ATPase dafür verwendet,  $\text{Na}^+$  aus der Zelle raus und  $\text{K}^+$  in die Zelle rein zu transportieren und dabei das Membranpotential zu generieren und aufrechtzuerhalten. Dieser etwa zweifach höhere Energieaufwand der neuronale Na-K-ATPase im Vergleich mit nicht erregbaren Zellen wird allgemein dem Mehraufwand zur Kompensation der größeren passiven Ionenströmen zugeschrieben, die bei der Erzeugung evozierter postsynaptischer Potentiale und APs entstehen. Schätzungen des zusätzlichen Energiebedarfes der Na-K-ATPase während der Erzeugung von Spikes mit einer Frequenz von 10 Hz ergaben eine Steigerung auf das 20-30 fache des Ruhewertes (Attwell and Laughlin, 2001; Lennie, 2003). Diese Abschätzungen sind möglicherweise zu hoch, da sie auf der Annahme beruhen, dass der Ladungstransfer  $Q$ , der durch den  $\text{Na}^+$  Einstrom während eines AP entsteht, durch  $Q = \alpha \cdot C \cdot dV$  gegeben ist. Hierbei bezeichnet  $C$  die Kapazität der Membran,  $dV$  die Änderung des Membranpotentials ( $\sim 100$  mV) und  $\alpha$  hat den Wert 4, wie durch Hodgkin in Tintenfischaxonen gemessen (Hodgkin, 1975), ist. Der Faktor  $\alpha$  steht für die Energieeffizienz der AP Generierung: umso kleiner die Überlappung des einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$  Stroms mit dem auswärts gerichteten  $\text{K}^+$  Strom ist, umso kleiner ist der Wert von  $\alpha$  (Sengupta et al.). Für Neuronen im Gehirn, variiert  $\alpha$  zwischen einem fast idealen Wert von 1.3 für axonale AP Propagation in hippocampalen Moosfasern (Alle et al., 2009) bis zu  $\alpha \sim 2.5$  in Purkinje Neuronen (Carter and Bean, 2009). Folglich sollte eine 10-fache Erhöhung des Energiebedarfs in aktiven Neuronen eine vernünftige Abschätzung sein. Dieser immer noch sehr hohe Bedarf steht im Widerspruch zu dem Befund, dass in funktional aktiven Hirnregionen der messbare Sauerstoffverbrauch nur um moderate 30 % steigt (Mintun et al., 2001). Diese Beobachtung und der 10-fach erhöhte ATP Bedarf für AP feuern führt zu der Schlussfolgerung, dass nur etwa 3% aller Neuronen gleichzeitig aktiv sind (Attwell and Laughlin, 2001; Lennie, 2003). Dieser kleine Anteil gleichzeitig aktiver Neuronen ist für etwa 25% des gesamten Energieverbrauches verantwortlich. Anders gesagt entfallen 75% des gesamten ATP Verbrauchs auf inaktive Neuronen (oder besser quasiinaktive, spontan feuern und damit zum Wachzustand beitragende Neuronen (Shulman et al., 2009)). Dieser überraschend hohe Anteil am Energieverbrauch von ruhenden Neuronen ist im wesentlichen auf zwei separate Anteile passiver Ionenflüsse über die Plasmamembran zurückzuführen, die von der Na-K-ATPase kompensiert werden müssen: (i) auf  $\text{Na}^+$  gekoppelte sekundär aktiver Transporte verschiedener Metabolite wie z.B. Bikarbonat (Romero et al., 2004), Aminosäuren (Mackenzie and Erickson, 2004; Verrey et al., 2004), Protonen (Orlowski and Grinstein, 2004), Ascorbinsäure (Takanaga et al., 2004) oder Nukleosiden (Gray et al., 2004) durch Membrantransporter der solute-linked carrier superfamily (SLC), und (ii) auf Leckströme durch nicht gesteuerte Ionenkanäle. Die erste Art von  $\text{Na}^+$  Ströme, die an die Aufnahme von Metaboliten gekoppelt ist, tritt in so gut wie jeder tierischen Zelle auf. Natrium getriebene Transporter in der Plasmamembran entstanden im Laufe der Evolution als Mittel zur

Sicherung osmotischer Stabilität und um wichtig Biomoleküle auch dann zu importieren, wenn deren Konzentration im extrazellulären Raum gering ist (Stein, 2002). In Neuronen stellt die Natrium getriebene Neurotransmitteraufnahme einen zusätzlichen Strom dar, der alleine bereits das Membranpotential um 5 mV depolarisieren kann (Chaudhry et al., 2002). Im Gegensatz dazu weiß man wenig über die physiologische Relevanz der zweiten Art von Ionenströmen, die aufgrund von Leckkanälen entstehen. Auf den ersten Blick scheint die ständige Kompensation dieser Ströme durch ATP getriebenen Pumpen Energieverschwendung zu sein. Man kann sich also fragen, warum die natürliche Evolution nicht in der Lage war, diesen Anteil am Energieaufwand durch Verminderung der Permeabilität dieser Leckkanäle zu senken und gleichzeitig die Charakteristiken des AP-Feuern beizubehalten. Die scheinbare Energieverschwendung für die Pumpen zur Kompensation der Leckströme auf diese Weise zu vermindern würde nicht nur den metabolischen Gesamtaufwand des Körpers senken, sondern auch die Propagationsgeschwindigkeit von axonalen AP erhöhen (Crotty et al., 2006).

Um sich mit dieser interessanten Frage zu beschäftigen und um zu untersuchen, ob es theoretisch möglich wäre, ein kosteneffizientes Neuron zu entwerfen und dadurch den Energiebedarf zu senken, benutzten wir eine leicht veränderte Version unseres mathematischen Modells aus Kapitel 1. Wir zeigen, dass es tatsächlich möglich sein sollte, ein solches Neuron zu entwerfen. Die Reduktion der Membranpermeabilitäten für die kleinen Ionenspezies destabilisiert jedoch die Membranspannung gegen zufällige Variation in den Ionenströmen. Das gilt insbesondere für Natriumströme, die den einwärts gerichteten Transport von zahlreichen gelösten Stoffen durch  $\text{Na}^+$  getriebene Transporter begleiten. Daraus schließen wir, dass die Permeabilität der Leckkanäle für Ionen, wie sie typischerweise in Neuronen und anderen erregbaren Zellen beobachtet werden, die untere Grenze darstellt, die notwendig ist, um unkontrolliertes Auslösen oder Unterdrücken von APs zu verhindern.

## 2.2 Modellbeschreibung



**Abbildung 2.1: Schematische Repräsentation der Modellprozesse.** Das Modell ist im Wesentlichen identisch mit dem Modell aus Kapitel 1. In Kurzfassung beschreibt das Modell das Verhalten des

**Membranpotentials, der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , die nicht diffusiblen organischen zellulären Moleküle (die Biomasse) und das Zellvolumen. Ionentransport über die Zellmembran umfasst passive (= Leck-) Ströme für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , einen einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$  Strom aufgrund von sekundär aktiven Transport von Metaboliten und Neurotransmitter, aktiven Transport von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  durch die Na-K-ATPase, und Ionenströme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  durch spannungsgesteuerte Kanäle. Erregung wird durch das Öffnen ligandengesteuerter Natriumkanäle (= exzitatorische Permeabilität) erreicht. Osmotischer Druck zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum, wird durch Wasseraustausch ausgeglichen.**

Für unsere computergestützten Untersuchungen benutzen wir eine leichte Modifikation des elektrophysiologischen Modells aus Kapitel 1 (siehe auch (Berndt et al., 2011)). Kurz zusammengefasst enthält das Modell die intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  sowie das Membranpotential, die Nettoladung der nicht diffusiblen organischen zellulären Moleküle (die Biomasse) und das Zellvolumen als Variablen. Ionentransport über die Membran teilt sich auf in passive Leckströme (für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), einen einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$  Strom aufgrund sekundär aktiver Metabolit- und Neurotransmittertransporte, aktiven Ionentransport durch die Na-K-ATPase (für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) sowie Ionenströme durch spannungsgesteuerte Kanäle (für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ). Erregung wird durch das Öffnen ligandengesteuerter  $\text{Na}^+$  Kanäle (entspricht der exzitatorischen  $\text{Na}^+$  Permeabilität) erreicht. Die Transmembrangradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  werden durch die Na-K-ATPase aufrechterhalten, die ebenfalls für das auf der zytosolischen Seite negative Membranpotential verantwortlich ist. Osmotisches Gleichgewicht zwischen der Zelle und dem Extrazellulärraum wird durch den Austausch von Wasser sichergestellt. Die Modellgleichungen und numerischen Werte der Parameter finden sich im Anhang zu Kapitel 2. Der  $\text{Na}^+$  Strom aufgrund von sekundärer Aufnahme von Metaboliten wurde bisher noch nicht experimentell bestimmt. In den meisten tierischen Zellen entfällt 1/3 des zellulären Energieaufkommens auf die Na-K-ATPase (Cornelius, 1996), wenn zellspezifische Funktionen der Pumpe wie z.B. Erregung und Neurotransmitteraufnahme vernachlässigt werden. Wir fixierten den Wert des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms auf die Hälfte des Gesamtnatriumstroms bei Ruhe (d.h. ohne Erregung und ohne Fluktuationen in den metabolischen Strömen). Damit entfällt die Hälfte des ATP Verbrauchs der Na-K-ATPase im Ruhezustand auf die Kompensation passiver Leckströme.

## **2.3 Ergebnisse**

### **2.3.1 Leckströme stabilisieren das Ruhemembranmembran**

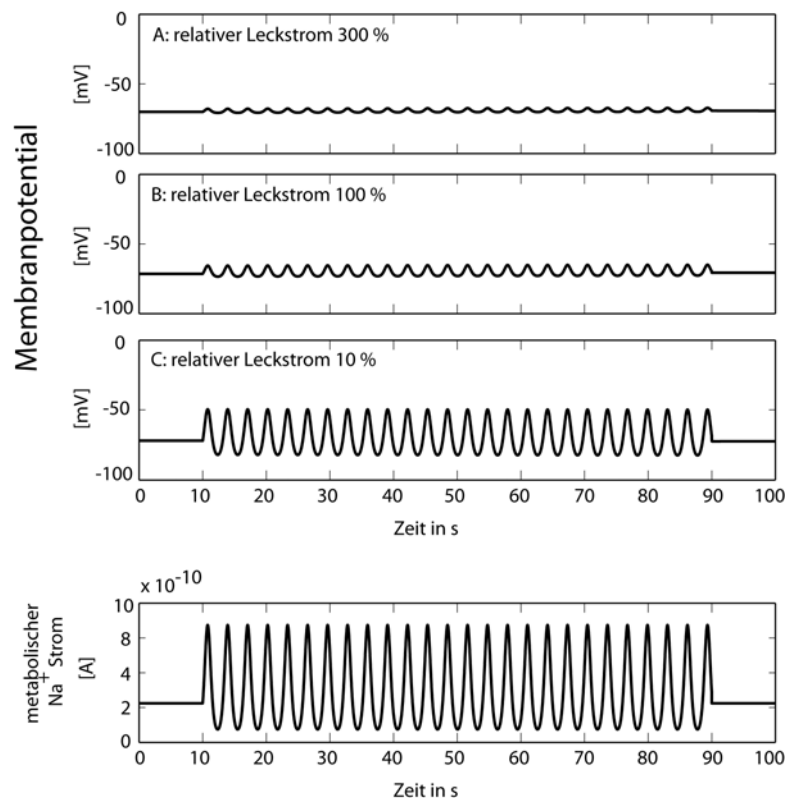
Zuerst untersuchten wir die Rolle von Leckströmen bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials gegenüber zufälligen Schwankungen in den metabolischen  $\text{Na}^+$  Strömen. Es gibt zwei verschiedenen Arten von Schwankungen. Erstens bringt es die stochastische Natur der  $\text{Na}^+$ -getriebenen proteingestützten Transportprozesse über die Membran mit sich, dass die Anzahl derjenigen Transporter, die Natrium gebunden haben, kleinen stochastische Schwankungen unterliegen. Diese Schwankungen finden in Zeitbereichen deutlich unterhalb einer Sekunde statt und führen zu ebenso kleine Schwankungen des Membranpotentials, die dann in der Größenordnung von  $\mu\text{V}$  liegen (Fishman and Dorset, 1973; Segal, 1972; Segal, 1974). Die zweite und für unsere Untersuchung sehr viel wichtigere Ursache von Schwankungen liegt in der zeitlichen Varianz von zellulären Verbrauchsprozessen und/oder Schwankungen in den Konzentrationen extrazellulärer Metabolite und Stoffe, die mit Natrium aufgenommen werden (wie z.B.  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Aminosäuren, ...). Diese Schwankungen finden normalerweise innerhalb von Minuten oder Stunden statt, können aber den durchschnittlichen  $\text{Na}^+$  Strom vervielfachen. Beispielsweise führt eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration der Aminosäure Alanin

um 1 mM zu einer Erhöhung des einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$  Stroms von ungefähr 100 nA in Oozyten (Chaudhry et al., 2002). Solche Veränderungen in extrazellulären Konzentrationen von Aminosäuren sind im Gehirn nicht unrealistisch, wenn man die dramatischen Anstiege in den Aminosäurekonzentrationen bedenkt, die sich während der ersten 10 Minuten von Pentylenetetrazole induzierten Anfallsleiden bei Glutamat (12 – 50 fach), Aspartat (14 – 33 Fach), Glycin (3-15 fach) und Glutamin (3 – 5.5 fach), gemessen in der Interstitialflüssigkeit im Hundehirn, ergeben (Sechi et al., 1997). In diesen Experimenten waren auch die Konzentrationen anderer Aminosäuren um das 2-10 fache erhöht, mit einer Verzögerung von 10-20 Minuten.

In unseren Simulationen betrachteten wir Variationen des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stromes zwischen  $1/3$  – und dem 3-fachen des Ruhewertes und berechneten die resultierenden Schwankungen im Membranpotential. Die Simulationen wurden bei verschiedenen Werten für die Permeabilitäten der Leckströme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  durchgeführt, die sich von ihren Standardwerten  $P_{X,L}^0$  ( $X = \text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ ) um einen gemeinsamen Skalierungsfaktor  $\gamma$  ( $0 < \gamma \leq 1$ ),  $P_{X,L} = \gamma P_{X,L}^0$  ( $X = \text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ ) unterschieden. Die Permeabilität von Kalium wurde nur insoweit dieser Skalierung unterworfen, insoweit sie der nicht-metabolischen Natriumpermeabilität entsprach. Dadurch wurde sichergestellt, dass das Ruhemembranpotential in allen Simulationen bei  $\sim -73 \pm 1$  mV lag und die internen Ionenkonzentrationen zwischen den Simulationen unverändert blieben.

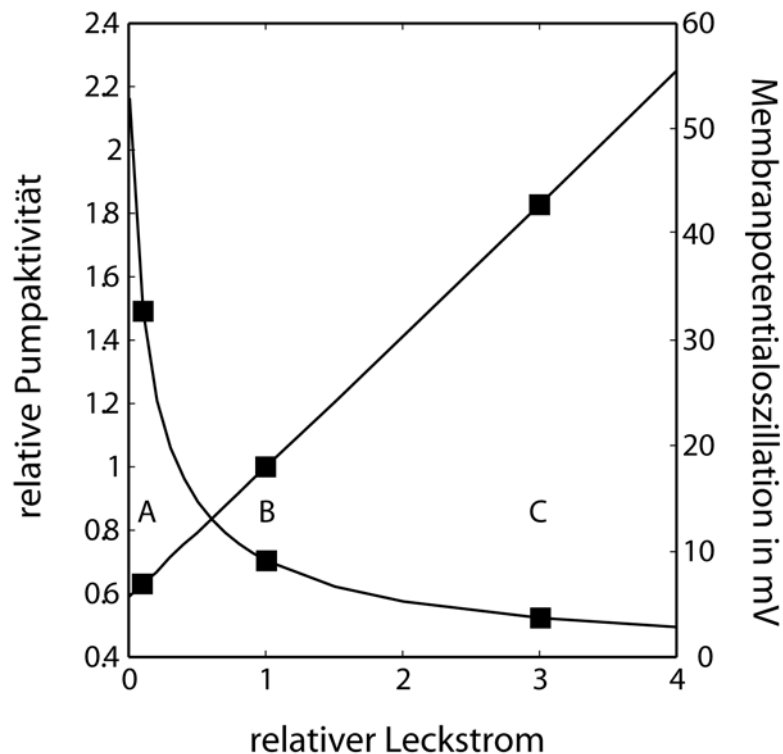
Abbildung 2.2 zeigt die Simulationsergebnisse für einen mit einer Frequenz von 0.3 Hz periodisch schwankenden metabolischen Natriumstrom. Die Oszillationen des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms führten zu synchronen Oszillationen des Membranpotentials. Im physiologischen Referenzzustand (Abbildung 2.2 B) hatte der durchschnittliche metabolische  $\text{Na}^+$  Strom dieselbe Größe wie der passive Natriumleckstrom. Veränderung der Leckpermeabilitäten derart, dass der  $\text{Na}^+$ -Leckstrom 300 % (Abbildung 2.2 A) oder 10 % (Abbildung 2.2 C) des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms betrug, führte zu einer fortschreitender Verstärkung der Amplitude der induzierten Oszillationen des Membranpotentials. Folglich führte eine Erhöhung der passiven Leckpermeabilitäten zu einer Dämpfung der Oszillationen des Membranpotentials, die durch die zeitliche Variation der Amplitude des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms induzierte werden.





**Abbildung 2.2** *Periodische, durch Schwankungen im metabolischen Na<sup>+</sup> Strom induzierte, Schwankungen des Membranpotentials.* Der metabolische Na<sup>+</sup> Strom schwankt mit einem Faktor zwischen 1/3 und 3 um seinen Referenzwert. In allen Simulationen wurde die Aktivität der Na-K-ATPase so gewählt, dass das Ruhemembranpotential  $-73 \pm 1$  mV betrug. (A) Erhöhung der Leckpermeabilität derart, dass der Na<sup>+</sup> Leckstrom 300 % des Referenzwertes betrug. Das Membranpotential oszillierte mit einer Amplitude von 2,5 mV. (B) Normaler physiologischer Referenzzustand. Der Na<sup>+</sup> Leckstrom war genauso groß wie der metabolische Na<sup>+</sup> Ruhestrom. Die Oszillationsamplitude des Membranpotentials betrug 8,5 mV. (C) Reduzierung der Leckpermeabilitäten derart, dass der Na<sup>+</sup> Leckstrom 10 % des Referenzwertes betrug. Das Membranpotential oszillierte mit einer Amplitude von 33,8 mV.

Der stabilisierende Effekt der erhöhten Leckströme wurde mit einem höheren Pumpaufwand der Na-K-ATPase bezahlt und ist damit mit einem höheren Energieaufwand für die Zelle verbunden. Das wird in Abbildung 2.3 verdeutlicht, in der die relative Aktivität der Na-K-ATPase und die Amplitude der induzierten Membranpotentialoszillationen als Funktion der Leckströme aufgetragen sind. Eine Verminderung des Na<sup>+</sup> Leckstroms auf 1 % des Referenzwertes verminderte den Pumpaufwand und damit den ATP Verbrauch um ca. 50 %. Während die Pumpaktivität linear mit den Leckströmen fiel, verminderte sich die Amplitude der induzierten Membranpotentialoszillationen auf nicht-lineare, hyperbolische Weise (Abbildung 2.3). Aufgrund dieser hyperbolischen Beziehung wurde eine weitere Dämpfung der Membranpotentialoszillationen durch zusätzliches Erhöhen der Leckströme zunehmend unbedeutender. Eine 4-fache Erhöhung der Na<sup>+</sup> Leckströme im Vergleich zum Referenzwert erhöhte den Energiebedarf der Pumpe auf das Doppelte, senkte allerdings die Oszillationsamplitude nur unwesentlich von 8,5 mV auf 3 mV. Folglich scheint es ein Optimum für die Energiemenge zu geben, die von der Na-K-ATPase aufgewendet werden muss um eine Rückstellung der passiven Leckströme zu bewerkstelligen und die Amplitude der Membranpotentialoszillationen unter einer Schwelle von 10 mV zu halten.

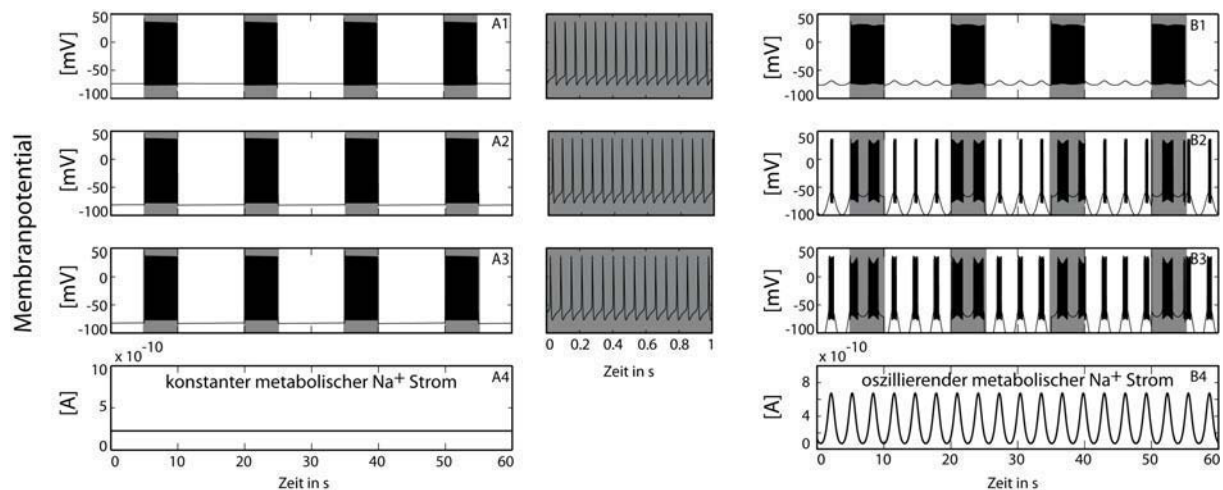


**Abbildung 2.3** Aktivität der Na-K-ATPase und Amplitude der Membranpotentialoszillationen in Abhängigkeit von der Größe des  $\text{Na}^+$  Leckstroms. Die Simulationsbedingungen waren dieselben wie in Abbildung 2.2. Die Permeabilität der passiven Ionenkanäle wurde schrittweise zwischen 0 % und 400 % des Referenzwertes variiert. In jeder Simulation wurde die Aktivität der Na-K-ATPase so angepasst, dass der Wert des Ruhemembranpotentials bei  $-73 \pm 1$  mV lag. Gezeigt werden die relativen Änderungen im Vergleich zum Referenzzustand. Die Quadrate beziehen sich auf die drei Fälle aus Abbildung 2 A-C.

### 2.3.2 Leckströme ermöglichen kontrolliertes Feuern von APs

Wie durch die vorhergehenden Simulationen gezeigt wurde, hat die Entstehung von sekundär aktiven ionengekoppelten Transportprozessen während der Evolution notwendigerweise auch zur Schaffung von passiven Leckströmen geführt, um das Membranpotential gegenüber Schwankungen in den metabolischen  $\text{Na}^+$  Strömen zu stabilisieren. Das Verhindern größerer unkontrollierter Schwankungen der Membranspannung mittels ausreichend großer Leckströme ist besonders wichtig für erregbare Zellen. Diese nutzen die kontrollierten Auslenkungen des Membranpotentials in Form von evozierten postsynaptischen Potentialen und APs zur Signalübermittlung entlang ihrer Membran und ins Zellinnere. Das Membranpotential erregbarer Zellen ist das Resultat von drei verschiedenen Arten von Ionenströmen. Die erste Art, die metabolische Ionenströme, weist dabei große zufällige Schwankungen auf, während die anderen beiden, die Leckströme und die gesteuerten Ströme, über die molekularen Eigenschaften und die Menge der sie tragenden Ionenkanäle sehr gut kontrolliert werden können. Der metabolische Strom verursacht unkontrollierte Änderungen des Membranpotentials, die sich störend auf die kontrollierten Änderungen des Membranpotentials auswirken, die von Ionenströmen durch die gesteuerten Kanäle getragen werden. Das wird in Abbildung 2.4 illustriert. Sie verdeutlicht den Einfluss der Leckpermeabilität auf das AP-Feuermuster. Der metabolischen  $\text{Na}^+$ -Strom wurde einmal als konstant (A) und einmal variabel modelliert (B). Um Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurden in diesen Simulationen die Eigenschaften der spannungsgesteuerten Kanäle und die Aktivität der Na-K-ATPase so justiert, dass die Ionenkonzentrationen, und damit die Gradienten, sowie das Membranpotential im Ruhezustand nahezu identisch waren und die

APs bei Erregung nahezu gleiche Form, Amplitude und Frequenz aufwiesen. Bemerkenswerterweise war es tatsächlich möglich, ein „Niedrigenergie-Neuron“ zu entwerfen, das mit Leckpermeabilitäten ausgestattet ist, die zwei Größenordnungen unter den beobachteten Werten liegen, während die Eigenschaften des AP-Feuerns bei konstantem metabolischem  $\text{Na}^+$  Strom unverändert blieben (siehe grau hinterlegte Paneele in Abbildung 2.4 A, die jeweils eine Sekunde AP-Feuern zeigen). Mit zunehmender Amplitude in den Schwankungen der metabolischen  $\text{Na}^+$  Ströme wird das AP-Feuern instabil. D.h. abhängig von der momentanen Stärke der metabolischen  $\text{Na}^+$  Ströme wird die Membran im Vergleich zum Ruhezustand depolarisiert oder hyperpolarisiert, so dass das Erreichen der zum Öffnen der spannungsgesteuerten  $\text{Na}^+$  Kanäle und zum Auslösen von AP benötigten Feuerschwelle mal erschwert und mal erleichtert wird. Das führt zu unkontrolliertem Auslösen oder Unterdrücken von AP (Abbildung 2.4 B). Offensichtlich erlaubt dieser Mangel an Reproduzierbarkeit es dem Neuron nicht, ein einkommendes Signal unzweideutig in ein auslaufendes Signal zu übersetzen. Daraus schließen wir, dass die Leckströme hinreichend groß sein müssen, um solche Unregelmäßigkeiten zu unterdrücken, und dass diese Reduktion der Störanfälligkeit mit einem hohen energetischen Aufwand für die Na-K-ATPase, die die Leckströme zurückstellen muss, bezahlt wird.



**Abbildung 2.4:** Einfluss der zeitlichen Veränderungen des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms auf das AP-Feuern bei verschiedener Stärke der Leckströme. Der mittlere metabolische Natriumstrom wurde auf 50 % des gesamten Natriumstroms im Ruhezustand gesetzt. In jeder Simulation wurde die Aktivität der Na-K-ATPase so angepasst, dass das Ruhemembranpotential den Wert  $73 \pm 1$  mV hatte. AP-Feuern wurde durch eine zeitweise konstante exzitatorische  $\text{Na}^+$  Permeabilität erreicht, die eine Dauer von 5 Sekunden (die grau hinterlegten Abschnitte) mit einer 10 Sekunden Pause zwischen aufeinander folgenden Erregungen hatte. Die Stärke der exzitatorischen  $\text{Na}^+$  Permeabilität war 1.25 fach größer als das zum Erreichen der Reizschwelle nötige Minimum. Die Permeabilität der Leckkanäle wurde relative zum metabolischen Ruhenatriumstrom von 100 % (A1, B1), auf 10 % (A2, B2), auf 1 % (A3, B3) vermindert. Gleichzeitig wurde die Eigenschaften der spannungsgesteuerten Kanäle so angepasst (siehe Anhang zu Kapitel 2), dass die Charakteristiken des AP-Feuerns (Amplitude, Form, Frequenz) nahezu unverändert blieben (siehe grau hinterlegte Paneele in (A), die das AP-Feuern für 1 Sekunde heranzoomt zeigen). (A) zeigt die Simulationen bei konstantem metabolischem Natriumstrom, (B) zeigt die Simulationen bei zwischen 1/3 und 3-fachen seines Ruhewertes oszillierendem metabolischem Natriumstrom. Das Vermindern der Leckpermeabilitäten führt bei variablem metabolischen Natriumstrom zu instabilem AP-Feuern, das sich im spontanem Auftreten von AP ohne Erregung aufgrund von zeitweiliger Depolarisation der Membran und zeitweiliger Unterdrückung von APs trotz Erregung aufgrund von Hyperpolarisation der Membran aufgrund der variierenden metabolischen Natriumströme zeigt.

## 2.4 Diskussion

Die molekulare Grundlage und die physiologische Rolle von Leckströmen sind immer noch schlecht verstanden. Offensichtlich müssen sie eine physiologische Rolle erfüllen, da die Evolution solche Kanäle hervorgebracht hat, die die basalen Permeabilitäten der Plasmamembran für Ionen um mehrer Größenordnung über die von gewöhnlichen reinen Doppellipidschichten heben (Hauser et al., 1972). Erst kürzlich wurde ein solcher Leckkanal, der spannungsabhängige, nicht selektive Kationenkanal (NALCN), der weithin in Gehirneuronen expremiert wird, in molekularer Auflösung charakterisiert (Lu et al., 2007). Dieser Kanal kann durch Neuropeptide wie Neurotensin und Substanz P aktiviert werden, was zeigt, dass die Regulation der Leckpermeabilitäten durch spezifische Liganden eine Möglichkeit darstellt, die Reizschwelle von Neuronen zu beeinflussen. Dasselbe gilt auch für die passiven Kaliumkanäle der TREK/TRAAK Familie, von denen angenommen wird, dass sie durch das Erhöhen der Membranpermeabilität bei Wirkung von inflammatorischen Agenten wie Arachidonsäure und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, und der damit einhergehende Hyperpolarisation der Membran, neuroprotektiv wirken (Fink et al., 1998).

Diese Eigenschaft von passiven Leckkanälen, die regulierte Modulation der Erregbarkeit von Neuronen zu ermöglichen (Goldstein et al., 2001), erklärt nicht, warum die passiven Permeabilitäten so groß sind. Wie durch unsere Simulationen in Abbildung 2.4. gezeigt wurde, können alle Eigenschaften des AP-Feuerns, wie auch die Modulation der Erregbarkeit eines Neurons mittels veränderter passiver Ionenpermeabilitäten, mit einem „Niedrigenergie-Neuron“ mit sehr kleinen Leckpermeabilitäten erreicht werden, solange die Variationen in den metabolischen  $\text{Na}^+$  Strömen vernachlässigbar sind. Unsere Simulationen zeigen, dass zumindest theoretisch eine geeignete Parametrisierung der spannungsgesteuerten Kanäle existiert, die die Charakteristiken des AP-Feuerns unverändert lässt, wenn die Leckpermeabilitäten für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  um zwei Größenordnungen vermindert werden. Dieses Ergebnis widerspricht älteren theoretischen Arbeiten, die behaupten, dass das Verringern der Leckpermeabilitäten die Zeit verlängert, die das Membranpotential benötigt in den Ruhezustand zurückzukehren und dieses daher aus Sicht der Informationsübermittlung problematisch sein könnte (Crotty et al., 2006).

Dass ein „Niedrigenergie-Neuron“ wenigstens zeitweilig existieren kann sieht man an der Fähigkeit von Hypoxie toleranten Tieren. Diese reduzieren zeitweilig konzentriert die Permeabilitäten ihrer Ionenkanäle und senken auf diese Weise in Zeiten von Hypoxie ihren Energiebedarf drastisch ab (Boutillier, 2001). Interessanterweise bezieht sich das Herunterfahren der Permeabilitäten in den Neuronen dieser Tiere auch auf die spannungsgesteuerten Natriumkanäle. D.h. die Reduktion des Energieaufwandes geschieht sowohl durch die Reduktion der Leckströme, als auch durch niedrigere Feuerraten. Wenn man unserer Simulationen zugrunde legt, ist es äußerst sinnvoll, die Leckpermeabilitäten und die Permeabilitäten der schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle gleichzeitig zu senken, da letztere die Erregbarkeit dieser Neuronen steuern und damit das durch noch aktive metabolische Ströme ausgelöste unkontrollierte AP-Feuern verhindern.

Wenn nicht vermeidbare Veränderungen in den metabolischen  $\text{Na}^+$ -Strömen berücksichtigt werden, macht eine Begrenzung der daraus resultierenden Schwankungen im Membranpotential eine gewisse Größe der Leckpermeabilitäten zwingend erforderlich (Abbildung 2.2). Aus den Amplituden der durch variierende metabolische  $\text{Na}^+$ -Ströme ausgelöste Membranpotentialsschwankungen ohne Erregung (Abbildung 2.3), und der Größe

der Hyperpolarisation bei wiederholter Erregung (Abbildung 2.4 B) schließen wir, dass der Leckstrom für mindestens 50 % der Ruheaktivität der Na-K-ATPase verantwortlich ist. Es muss betont werden, dass der Einfluss des metabolischen  $\text{Na}^+$  Stroms auf das Membranpotential nicht vom zeitlichen Profil der Fluktuationen abhängt. In unseren Simulationen benutzten wir einen periodischen, mit hoher Frequenz oszillierenden metabolischen  $\text{Na}^+$ -Strom; ein anderes zeitliches Profil würde nur das Zeitprofil der resultierenden Depolarisationsphasen und Hyperpolarisationsphasen des Membranpotentials ändern. Nach unserer Argumentation ist das Haupthindernis, das der Realisierung eines „Niedrigenergie-Neurons“ im Wege steht, die Existenz von unvermeidbaren Schwankungen in den metabolischen  $\text{Na}^+$  Strömen. Diese sind mit der Aufnahme einer großen Anzahl von für den intakten Metabolismus und die neuronale Funktionalität unentbehrlichen Metaboliten, wie z.B. Neurotransmittern, gekoppelt. Aufgrund ihrer molekularen Struktur weisen an  $\text{Na}^+$  gekoppelte Transporter oft einen von Transport unabhängigen (nicht gekoppelten) Leckstrom auf (DeFelice and Goswami, 2007). In Neuronen führt die natriumgekoppelte Wiederaufnahme von Neurotransmittern zu großen Variationen in den metabolischen  $\text{Na}^+$  Strömen. Aufgrund von realistischen Abschätzungen der Kanalpermeabilität schließen wir aus unseren Simulationen, dass die Leckströme in Neuronen gerade groß genug sind, um Schwankungen im Membranpotential unter 10 mV zu halten und damit trotz ständiger Veränderungen in den an  $\text{Na}^+$  gekoppelten metabolischen Strömen sicheres und kontrolliertes AP-Feuern zu ermöglichen. Ein wesentlicher Anteil des überraschend hohen Energiebedarfs des ruhenden Neurons kann damit der Aktivität der Na-K-ATPase zugeordnet werden, die benötigt wird um diese Leckströme zurückzustellen.

# Kapitel 3: Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs in Hirnschnitten bei verschiedenen Aktivitätszuständen

## 3.1 Einführung

Das Gehirn erhält etwa 20 % des Herzauswurfvolumens und ist besonders anfällig gegenüber Hypoxie, woraus folgt, dass Gehirnaktivität mit besonders hohen metabolischen Kosten verbunden ist (siehe Kapitel 2, (Erecinska and Silver, 2001)). Obwohl der Gesamtsauerstoffverbrauch des Gehirns beinahe konstant ist, können bei verschiedenen Aktivitätsmustern große lokale Schwankungen in den betroffenen Hirnregionen auftreten (Fox et al., 1988; Shulman et al., 2001). Lokale Änderungen im Sauerstoffverbrauch in vivo werden aus der Steigung des Abfalls des Sauerstoffpartialdrucks im Interstitium während unterbundener Sauerstoffversorgung (Lenigerfollert, 1977) oder Aktivierung bestimmter Hirnregionen (Fox et al., 1988; Masamoto et al., 2003; Thomsen et al., 2009) bestimmt. Solche Messungen werden jedoch stark durch die schnelle Anpassung des cerebralen Blutflusses, der bei Störung der Sauerstoffhomeostase eintritt, beeinflusst (Kasischke et al., 2011; Masamoto et al., 2003). Aufgrund dieser kompensatorischen hämodynamischen Response, sind die relativen Änderungen in der Oxygenierung des Blutes, wie sie vom BOLD-Kontrast (von englisch blood oxygenation level dependent, also abhängig vom Sauerstoffgehalt des Blutes) gemessen werden, nur in der Größenordnung von einigen Prozent. Das kann zu Fehleinschätzungen über die tatsächlichen Änderungen im Sauerstoffverbrauch führen (Kim and Ugurbil, 1997; Mayhew et al., 2001).

Die methodischen Hindernisse bei der Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs bei verschiedenen Aktivitätszuständen können mit Hirnschnitten umgangen werden (Hajos et al., 2009; Kann and Kovacs, 2007), in denen es keine hämodynamische Response gibt. Hirnschnitte ermöglichen es mittels Mikroelektroden lokal sowohl den Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), als auch Erregungsmuster durch Ableitung lokaler Feldpotential (LFP) zu messen. Außerdem können Messungen unter wohl definierten Bedingungen, wie z.B. konstanter Sauerstoffversorgung oder vom Experimentator induzierten, besonderen Aktivitätsformen im neuronalen Netzwerk, durchgeführt werden (Fisahn et al., 1998; Hajos et al., 2009; Huchzermeyer et al., 2008).

Unser Ziel ist die Bestimmung des Sauerstoffverbrauch bei drei verschiedenen Aktivitätszuständen (hoch, mittel, niedrig) im neuronalen Netzwerk der hippocampalen CA3 Region unter der Verwendung von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen. Für den hohen Aktivitätszustand wurden schnelle Netzwerkoszillationen im Gammafrequenzbereich (30-100 Hz, GAM) durch die Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin ausgelöst (Bartos et al., 2007; Huchzermeyer et al., 2008). Gammaoszillationen zeigen in vivo und in vitro ähnliches Verhalten (Bartos et al., 2007; Traub et al., 1996) und werden mit einem hohen Energieaufwand in Zusammenhang gebracht (Barth and Mody, 2011; Hajos et al., 2009; Kann et al., 2011). Als mittlere Aktivitätsform wurde die spontane Netzwerkaktivität (SPON) genommen, die in hippocampalen Schnittkulturen auch ohne corticale Stimulation auftritt (Huchzermeyer et al., 2008; Sasaki et al., 2007). Als niedrigen Aktivitätszustand wurde die komplette Abwesenheit von APs (TTX) gewählt, was durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) erreicht wird, welches die schnellen spannungsgesteuerten  $Na^+$  Kanäle blockiert und damit die Entstehung von APs unterdrückt. Für die detaillierte Analyse der  $pO_2$ -Profile benutzten wir ein mathematisches Reaktions-Diffusions-Modell (RDM), um den Sauerstoffverbrauchs zu quantifizieren.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Experimentelle Methoden

Die Probenpräparation und Messungen wurden in der Abteilung unseres experimentellen Kooperationspartners, Prof. Oliver Kann, durch seine Mitarbeiterin Frau Dr. Christine Huchzermeyer durchgeführt. Die Aktivitätsmuster und Sauerstofftiefenprofile von hippocampale Hirnschnitte wurden unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Der Versuchsaufbau und die experimentellen Methoden sind in Huchzermeyer et al. (Huchzermeyer et al., 2012) zu finden. Die uns übergebenen Sauerstofftiefenprofile sind mit Auswertung im Anhang zu Kapitel 3 zu finden.

### 3.2.2 Theoretische Methoden– Das Reaktions-Diffusions-Modell (RDM)

Die aufgenommenen  $pO_2$  Profile wurden mit einem mathematischen Modell reproduziert, das den Sauerstofftransport durch das neuronale Gewebe und den aktivitätsabhängigen Sauerstoffverbrauch berücksichtigt. Das Modellschema ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Wir zerlegten den Schnitt in  $N$  Schichten mit einer Dicke von jeweils  $1\ \mu m$  ( $\Delta x = 1\ \mu m$ ). In jeder Schicht wurde die Sauerstoffkonzentration und der Sauerstoffverbrauch als konstant angenommen.

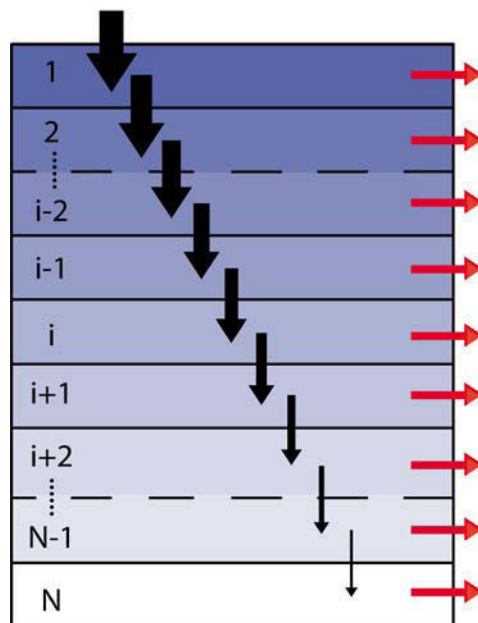


Abbildung 3.1: *Modellschema*: Der Schnitt wird von der Oberfläche bis zum Auftreten des  $pO_2$  Minimums in  $N$ -Schichten mit der Dicke  $1\ \mu m$  zerlegt. Im stationären Zustand ist der Abfluss aus der Schicht  $i$  ist gleich dem Zufluss in die Schicht  $i+1$  (schwarze Pfeile). Der Strom setzt sich aus einem diffusiven und einem konvektiven Anteil zusammen (siehe Text). Der Verbrauch ist in allen Schichten gleich (rote Pfeile). Der  $pO_2$  nimmt zum Minimum hin monoton ab (von Blau nach weiß)

Die zeitliche Veränderung des  $pO_2$  in der  $i$ -ten Schicht

$$\frac{d(pO_2^i)}{dt} = I_{\text{Einfuss}}^i - v_{\text{Verbrauch}}^i - I_{\text{Abfluss}}^i \quad (1)$$

ist die Summe von drei Komponenten: der Zufluss aus der darüber liegenden Schicht (i-1), der Verbrauch in der Schicht und der Abfluss in die darunter liegende Schicht (i+1), wobei die Schichten von der Oberfläche bis zur Mitte fortlaufend gezählt werden (1 ist die oberste Schicht und N die Schnittmitte). Für den Sauerstoffverbrauch wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik angenommen (McGoron et al., 1997):

$$v_{\text{Verbrauch}}^i = A \cdot \frac{pO_2^i}{pO_2^i + K_m^{pO_2}} \quad (2)$$

Die Konstante A beschreibt die Zelldichte der jeweiligen Schicht und die durchschnittliche Aktivität der Neuronen und Gliazellen. Sie wird für alle Schichten als gleich angenommen. Der Wert von  $K_m$  wurde auf 3 mm Hg gesetzt (Kasischke et al., 2011). Da alle gemessenen  $pO_2$  Profile einen konvexen Verlauf aufweisen (siehe weiter unten und im Anhang zu Kapitel 3), modellierten wir den Zustrom als die Summe von zwei Einflüssen. Der eine Einfluss beschreibt die Sauerstoffdiffusion mittels des Fickschen Gesetzes:

$$I_{\text{Zufluss-diff}}^i = D \cdot \frac{pO_2^{i-1} - pO_2^i}{\Delta x^i}, \quad (3)$$

mit der Diffusionskonstanten D. Als Wert haben wir  $D = 1.6 \cdot 10^3 \frac{\mu m^2}{s}$  genommen, der für neuronales Gewebe gemessen wurde (Evans et al., 1981; Homer et al., 1983). Die zweite Komponente beschreibt einen konvektiven Sauerstofftransport von der Schicht i zur Schicht i+1:

$$I_{\text{Zufluss-c}}^i = B_c^i \cdot \frac{pO_2^{i-1} - pO_2^i}{\Delta x^i} \quad (4)$$

Anpassen des Models an die gemessenen  $pO_2$  Profile machte deutlich, dass  $B_c^i$  sehr gut durch einen exponentialen Abfall beschrieben werden kann:

$$B_c^i = B_0 \exp\left(-\frac{\lambda}{x^i}\right). \quad (5)$$

Der Parameter  $\lambda$  bestimmt die Steilheit des  $pO_2$ -Abfalls und  $x^i$  den Abstand der i-ten Schicht von der Oberfläche. Der Druckparameter  $B_0$  ist durch den experimentellen Aufbau gegeben und wurde bei allen Simulationen konstant gehalten.

Massenerhaltung erfordert, dass der Abfluss aus der i-ten Schicht gleich dem Zufluss in die i+1-te Schicht ist:

$$I_{\text{Abfluss}}^i = I_{\text{Zufluss}}^{i+1}. \quad (6)$$

Gleichung (1) muss noch durch Randbedingungen komplettiert werden. Das Model wurde an den Teil der gemessenen Sauerstofftiefenprofile zwischen der Oberfläche und dem  $pO_2$  Minimum angepasst, da dort wohl definierte Randbedingungen herrschen. Da die



Sauerstoffkonzentration an der Oberfläche der Schnittkultur durch ständige Begasung, konstant gehalten wird, gelten dort *Neumann* Randbedingungen:

$$pO_2^1 = \text{konst.} \quad (7)$$

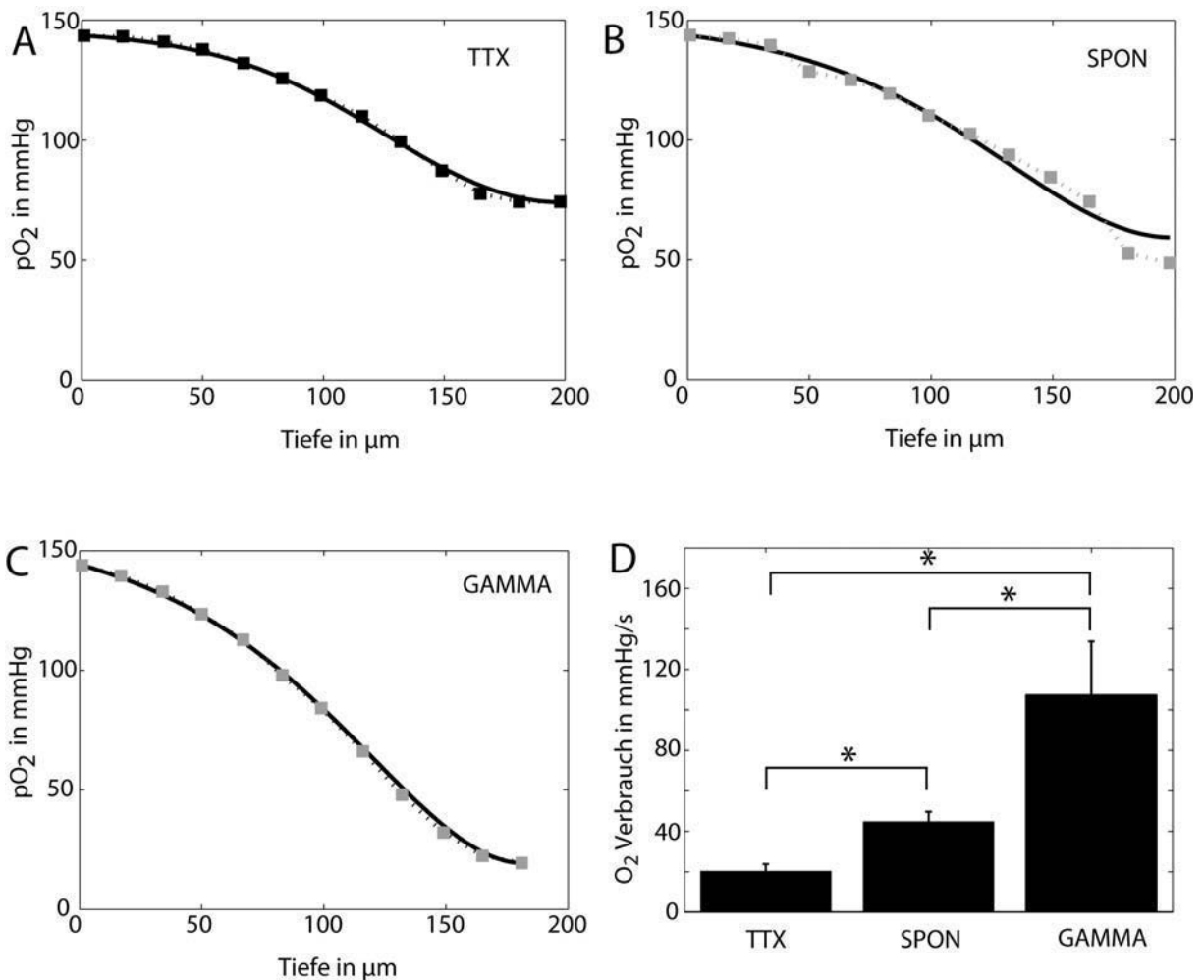
In der Schicht (N), in der der  $pO_2$  sein Minimum erreicht muss der Sauerstoffabfluss Null sein (*Dirichlet* Randbedingungen)

$$I_{\text{Abfluss}}^N = 0. \quad (8)$$

Für alle Schnittkulturen wurden die zwei Parameter  $A$  und  $\lambda$  durch minimieren des quadratischen Abstandes der Modellsimulationen an das jeweilige Tiefenprofil bestimmt.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs



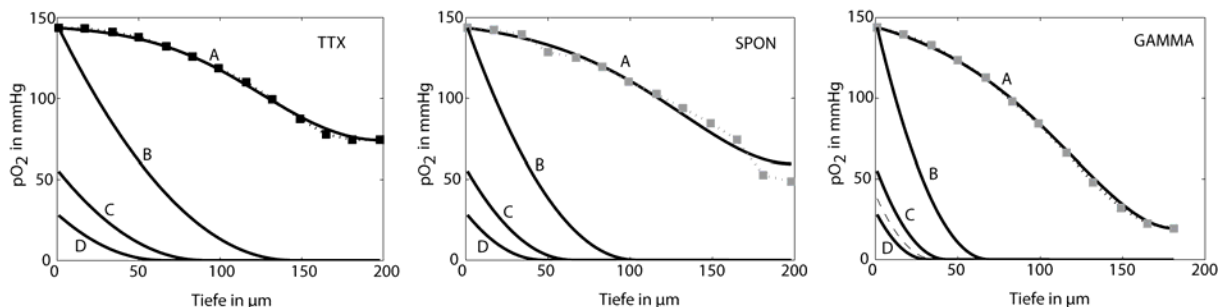
**Abbildung 3.2: Modellkurven (Fits) und experimentelle  $pO_2$  Profile sowie errechneter relativer mittlerer Sauerstoffverbrauch in den verschiedenen Aktivitätszuständen.** Repräsentative Fits (durchgezogene Linien) und experimentelle  $pO_2$  Profile (gestrichelte Linien mit Messwerten) für die drei Aktivitätszustände in der hippocampalen CA3 Region. (A) zeigt ein  $pO_2$  Profil aufgenommen im TTX Zustand, (B) bei spontaner

Netzwerkaktivität (SPON) und (C) bei Gammaoszillationen. Alle  $pO_2$  Profile weisen konvexes Verhalten auf. Die experimentellen Daten wurden von der Schnittoberseite bis zum  $pO_2$  Minimum gefittet (und nur dieser Bereich ist dargestellt). (D) zeigt die den relativen mittleren Sauerstoffverbrauch ohne Aktivität (TTX,  $n=8$ ), bei spontaner Netzwerkoszillation (SPON,  $n=17$ ) und während Gammaoszillation (GAM,  $n=8$ ). Der Sauerstoffverbrauch ist bei Gammaoszillation etwa 2.2 und 5.3-fach erhöht im Vergleich mit Spontanaktivität und unterdrückter Aktivität. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern markiert ( $P<0.05$ , paarweiser einseitiger t-Test).

Um den Sauerstoffverbrauch zu quantifizieren benutzen wir das Reaktions-Diffusions-Modell des vorigen Abschnitts. Alle  $pO_2$  Profile wurden einzeln mit dem Modell reproduziert. Die freien Modellparameter waren die charakteristische Länge  $\lambda$  sowie der Sauerstoffverbrauch  $A$  in jeder einzelnen Schnittkultur, sowie die Druckkomponente  $B_0$  für alle Schnittkulturen. Die Fitgüte die mit dem Modell erreicht werden kann ersieht man an den Fits in Abbildung 3.2. Der Durchschnitt der  $r^2$ -Werte war in allen drei Gruppen vergleichbar (TTX:  $0.957\pm 0.031$ ; SPON:  $0.984\pm 0.003$ ; GAM  $0.997\pm 0.001$ ). Alle  $pO_2$ -Profile und die dazugehörigen Fits sind im Anhang zu finden. Aufgrund der Modellergebnisse ist klar, dass der Anteil des konvektiven Sauerstofftransports den diffusiven Anteil am Sauerstofftransport im oberen Teil dominiert, in dem das experimentell bestimmte  $pO_2$ -Profil konvex ist (siehe Unten). Wir nehmen an, dass der Grund hierfür im experimentellen Aufbau liegt.

Der Vergleich des Durchschnittsverbrauchs in den drei Aktivitätszuständen in der CA3 Region zeigt, dass bei höherer Aktivität ein erhöhter Sauerstoffverbrauch vorliegt (Abbildung 3.2 D). Der relative Sauerstoffverbrauch während Gammaoszillation (GAM) war 2.2-fach höher als bei spontaner Netzwerkaktivität und 5.3-fach erhöht im Vergleich zu nicht aktiven Schnitten.

### 3.3.2 Bedeutung für die Sauerstoffversorgung von neuronalen Gewebe *in vivo*



**Abbildung 3.3: Anwendung des Modells zur Abschätzung der Sauerstoffversorgung *in vivo*.** Dargestellt sind die experimentellen Werte (kleine Quadrate) und simulierten  $pO_2$  Profile (durchgezogene Linien A) für verschiedenen Randbedingungen und Aktivitätszustände. (TTX) zeigt die Simulationen im TTX Zustand, (SPON) bei Spontanaktivität und (GAMMA) bei Gammaoszillationen. In jedem Panel zeigt die oberste Linie A den Fit an die experimentellen Daten, die Linie B das simulierte  $pO_2$  Profil unter der Annahme, dass es keinen konvektiven Sauerstofftransport gibt (siehe Text), die Randbedingungen und der Sauerstoffverbrauch aber unverändert sind. Wenn man zu physiologischen Randbedingungen von 55 mmHg (Linie C) bzw. 28 mmHg (Linie D) übergeht und den Sauerstoffverbrauch auf dem selben konstanten Wert hält, erkennt man am simulierten  $pO_2$  Profil, in welchem Abstand vom Gefäß das neuronale Gewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann. In (GAMMA) zeigt die gestrichelte Linie das  $pO_2$  Profil an, das mit dem geringsten möglichen  $pO_2$  im Gefäß ( $\sim 40$  mmHg) noch in der Lage ist, Gammaoszillationen bis zu einer Entfernung von  $\sim 35$   $\mu m$  auf halbem Wege zwischen Kapillaren aufrecht zu erhalten. Ein geringerer  $pO_2$  im Gefäß erfordert eine hämodynamische Response um Gammaoszillationen aufrecht zu erhalten.

Nach unseren Ergebnissen dominiert der konvektive Anteil des Sauerstofftransports den diffusiven Anteil. Die Notwendigkeit dieser konvektiven Komponente für die ausreichende Versorgung des Schnittes in den tiefer liegenden Schichten ist in Abbildung 3.3 dargestellt, in dem der konvektive Anteil abgestellt wurde. Das sich dann ergebende  $pO_2$ -Profil zeigt, dass sowohl bei spontanen Netzwerkoszillationen, als auch bei induzierten Gammaoszillationen der Sauerstoffpartialdruck in einer Tiefe von weniger als 70  $\mu m$  bzw. 100  $\mu m$  auf Null absinkt. Dieses Ergebnis entspricht der experimentellen Beobachtung, dass bei abgeschalteter Begasung (entspricht einer verschwindenden Druckkomponente in Gleichung 5) der Schnitt zu schwellen beginnt und nekrotisch wird. Unter diesen Bedingungen war es experimentell nicht möglich ein stationäres Sauerstoffprofil aufzunehmen.

Um unser Model auf die in vivo Situation anzuwenden, in der der Sauerstoff von den Kapillaren das Hirnparenchym nur durch Diffusion erreicht, haben wir wiederum den konvektiven Sauerstofftransport ausgeschaltet und den  $pO_2$  auf 50 mmHg bzw. 28 mmHg gesetzt. Diese Werte wurden für den physiologischen  $pO_2$  in vivo gemessen (Devor et al., 2011; Kasischke et al., 2011; Vovenko, 1999). Die Simulationen zeigen, dass bei spontaner Netzwerkaktivität und bei Gammaoszillationen eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Hirnparenchyms nur in einem Radius von 30-60  $\mu m$  um das Blutgefäß möglich ist (Abbildung 3.3B und 3.3C). Die Simulationen zeigen auch, dass ein vaskulärer Sauerstoffpartialdruck von 40 mmHg ausreicht, um Gammaoszillationen in einem Abstand von  $\sim 35 \mu m$  um die Kapillare zu gewährleisten (Abbildung 3.3C). Interessanterweise stimmt dieser kritische Radius mit den gemessenen Entfernungen der Mitte zwischen zwei Kapillaren im Gehirn überein, welche bei 30-40  $\mu m$  liegen (Tata and Anderson, 2002; Vovenko, 1999). Sind die Sauerstoffpartialdrücke in Blutgefäß niedriger, wird daher eine hämodynamische Response erforderlich, um Gammaoszillationen aufrechtzuerhalten (Devor et al., 2011).

### 3.4 Diskussion

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den Sauerstoffverbrauch in Hirnschnitten über einen möglichst großen Bereich im Energieverbrauch zu bestimmen. Hierfür wurde der Sauerstoffverbrauch in Hirnschnitten in drei verschiedenen Aktivitätszuständen - hoch, mittel und niedrig - bestimmt.

Gammaoszillationen wurden in vivo in fast allen neocorticalen Strukturen von Säugetieren und im Hippocampus beobachtet (Bartos et al., 2007; Uhlhaas and Singer, 2010). Sie können in vitro zuverlässig durch die Zugabe von Acetylcholin oder Kainat in niedrigen Konzentrationen ausgelöst werden, die cholinerge bzw. glutamaterge Rezeptoren aktivieren (Fano et al., 2007; Fisahn et al., 1998). Solche Gammaoszillationen in akuten hippocampalen Schnitten und Schnittkulturen weisen wichtige Gemeinsamkeiten mit hippocampalen Gammaoszillationen in vivo auf (Kann et al., 2011; Whittington et al., 2000) und werden mit einem hohen Energieaufwand in Zusammenhang gebracht (Barth and Mody, 2011; Hajos et al., 2009; Kann et al., 2011). Daher können Gammaoszillationen in vivo und in vitro als Repräsentant eines physiologischen Erregungszustands mit hohem Energiebedarf verwendet werden, der mit höheren kognitiven Funktionen, wie der Verarbeitung von sensorischen Input, Gedächtnisbildung und Aufmerksamkeitsselektion verbunden ist (Bartos et al., 2007; Uhlhaas and Singer, 2010).

Als mittlere Aktivitätsform wurde die spontane Netzwerkaktivität (SPON) genommen, die in hippocampalen Schnittkulturen auch ohne corticalen Stimulation auftritt (Huchzermeyer et al., 2008; Sasaki et al., 2007). Der Zustand der Spontanaktivität könnte vergleichbar sein mit einem Zustand des Gehirns, bei dem APs nicht unterdrückt sind, aber externe afferente Eingaben, wie z.B. optische oder visuelle Reize, fehlen. Spontanaktivität weist in Schnittkulturen eine hohe Variabilität auf (Huchzermeyer et al., 2008; Sasaki et al., 2007),

was mit spontanen Fluktuationen im BOLD Signal korrelieren könnte, wie sie auch ohne expliziten Input oder Output beobachtet wurden (Fox and Raichle, 2007).

Als niedrigen Aktivitätszustand wurde die komplette Abwesenheit von APs (TTX) gewählt, was durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) erreicht wird. TTX blockiert die schnellen spannungsgesteuerten Natriumkanäle und unterdrückt damit die Entstehung von APs im neuronalen Gewebe. Viele andere Prozesse wie die Aufrechterhaltung des Membranpotentials oder die quantale Ausschüttung von Neurotransmitter mit anschließenden postsynaptischen Potentialen bleiben von TTX unbeeinflusst. Daher ist TTX ein gutes Model für einen inaktiven Zustand. Da berichtet wurde, dass Anästhetika sich äußerst störend sowohl auf die neuronale Aktivität als auch auf den Energiemetabolismus auswirken (Muravchick and Levy, 2006; Whittington et al., 2000) unterscheiden sich die Messungen in diesem Zustand bis zu einem bestimmten Grad von  $pO_2$  Messungen in anästhesierten Tieren. Außerdem wurde kürzlich in anästhesierten Ratten gezeigt, dass der lokale Sauerstoffverbrauch durch alle Aspekte der neuronalen Signalgebung erheblich ansteigt, z.B. durch spontane oder Stimulus induzierte Spikes in den Purkinjezellen und durch postsynaptische Prozesse im cerebralen Kortex, während ein großer Teil des basalen Sauerstoffverbrauchs durch TTX unbeeinflusst blieb (Thomsen et al., 2009).

In Schnittpräparationen muss der Sauerstoff eine längere Wegstrecke vom Anlieferungspunkt (hier die Schnittoberfläche) zur Zelle zurücklegen, als im intakten Gewebe, in dem aktiver Sauerstofftransport mittels des Blutflusses erfolgt. Der Abfall im  $pO_2$  kann daher sowohl von dem aktivitätsabhängigen Sauerstoffverbrauch als auch von einer begrenzten Sauerstoffversorgung herrühren. Um eine verlässliche Abschätzung über den relativen Sauerstoffverbrauch in den verschiedenen Aktivitätszuständen zu erreichen, entwickelten wir ein mathematisches Model, das beide Prozesse berücksichtigt. Da alle  $pO_2$  Profile im oberen Teil ein konvexes Verhalten aufweisen, haben wir einen exponentiell abfallenden konvektiven Sauerstofftransport (charakteristische Länge  $\sim 40 \mu m$ ) zusätzlich zum diffusiven Sauerstofftransport mit ins Model aufgenommen. Nach unserem Wissen wurde ein anfänglicher konvexer Verlauf in  $pO_2$  Tiefenprofilen bisher nicht berichtet. Das ist möglicherweise dadurch bedingt, dass Messungen oftmals an viel dickere Hirnschnitte (1-1.5 mm) und mit einer viel geringeren räumlichen Auflösung (von  $\sim 100 \mu m$ ) durchgeführt wurden. Trotzdem kann man den initialen konvexen Teil auch bei illustrierten  $pO_2$  Profilen älterer Veröffentlichungen finden (Brockhaus et al., 1993; Chun et al., 1991).

Mit Hilfe unseres mathematischen Models waren wir in der Lage, den Sauerstoffverbrauch bei Gammaoszillation (GAM) relativ zum Verbrauch bei Spontanaktivität (SPON) und unterdrückter Aktivität (TTX) zu quantifizieren. Die modellgestützte Auswertung der experimentellen Daten ergab, dass Spontanaktivität und Gammaoszillationen einen 2.5 bzw. 4.9-fach höheren Sauerstoffverbrauch im Vergleich mit dem TTX Zustand aufweisen. Daraus schließen wir, dass die maximale Varianz in der Aktivität der Atmungskette etwa einen Faktor von fünf ausmacht.

Es ist allerdings wichtig festzuhalten, dass Gammaoszillationen mit hoher Frequenz in der hippocampalen CA3 Region entstehen. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass neuronale Mitochondrien in diesem Gebiet enzymatische Eigenschaften aufweisen, die es ihnen ermöglichen, den hohen energetischen Anforderungen der Gammaoszillationen zu entsprechen (Kann et al., 2011). Solche besonderen elektrophysiologischen und biochemischen Eigenschaften müssen nicht notwendigerweise auf andere corticale Regionen die Gammaoszillationen aufweisen übertragbar sein (Uhlhaas and Singer, 2010).

Unsere Abschätzungen des relativen Sauerstoffverbrauchs bei unterschiedlichen Aktivitätszuständen in Schnittkulturen sind jedoch in guter Übereinstimmung mit neueren in vivo Daten, nach welchen der basale Energieverbrauch des tief anästhesierten Hirns etwa 20 % des normalen, wachen Hirns ausmacht und nach denen bei der Grenze zur Bewusstlosigkeit der Energieverbrauch um 40-50 % abnimmt (Shulman et al., 2009).

In vivo hängt die Verfügbarkeit von Sauerstoff vom aktiven Transport durch die Blutgefäße und der passiven Diffusion durch das Hirngewebe ab. Erhöhte neuronale Aktivität ist mit einer lokalen Erhöhung des Blutflusses innerhalb weniger Sekunden verbunden, der die Oxygenierung auf dem Niveau der Kapillare deutlich erhöht (Buxton, 2010; Masamoto et al., 2003; Offenhauser et al., 2005). Von der Kapillare muss der Sauerstoff in das Hirnparenchym diffundieren. Oxygenierung des Gewebes nur durch Diffusion wurde durch die Simulationen nachgestellt, in denen der konvektive Anteil des Sauerstofftransports auf Null gesetzt wurde und der  $pO_2$  an der Grenzfläche von Kapillare und Gewebe zwischen 58 mmHg und 28 mmHg variiert wurde (Kasischke et al., 2011; Vovenko, 1999). Das resultierende  $pO_2$  Profil zeigt, dass die Sauerstoffversorgung während Gammaoszillationen nur in einem Gebiet im Abstand von 30-40  $\mu m$  von der Kapillare möglich ist, was mit dem interkapillaren Abstand von 40-70  $\mu m$  in Menschen und Nagetieren übereinstimmt (Kasischke et al., 2011; Meieringer et al., 1985; Tata and Anderson, 2002). Daraus schließen wir, dass das vaskuläre System so ausgelegt ist, dass es gerade den Energieaufwand befriedigen kann, der mit hoch aktiven Zuständen wie der Gammaoszillation verbunden ist. Umgekehrt erlauben es größere interkapillare Abstände nicht Gammaoszillationen über längere Zeiten aufrecht zu erhalten (Lutz et al., 2004), wenn nicht andere Mechanismen, wie z.B. eine kompensatorische hämodynamische Response einsetzen (Devor et al., 2011; Niessing et al., 2005). Diese Schlussfolgerung wird von der Beobachtung unterstützt, dass eine starke geometrische Verbindung zwischen Vaskularisierung und Sauerstoffverfügbarkeit besteht (Kasischke et al., 2011), und dass unter hypoxischen Bedingungen der interkapillare Abstand durch erhöhte Angiogenese verkürzt wird (LaManna et al., 2004). Das vaskuläre System wird also nur so weit ausgebaut, als es zur Versorgung bei hoher energetischer Belastung erforderlich ist.

# Kapitel 4: Mathematisches Modell der Kurzzeitregulation des neuronalen Energiestoffwechsels

## 4.1 Einführung

Das Gehirn macht nur 2 % der Körpermasse aus, verbraucht aber 20 % des gesamten Sauerstoffaufkommens des Körpers, was auf einen außerordentlich hohen oxidativen Metabolismus schließen lässt. Der weitaus größte Anteil des Energieverbrauchs des Gehirns kann dabei Neuronen zugeschrieben werden (Herculano-Houzel, 2011). Der Energieverbrauch von einzelnen Neuronen kann abhängig vom Aktivitätszustand sehr unterschiedlich sein (siehe auch Kapitel 3). Theoretische Abschätzungen legen nahe, dass aktive Neuronen, die mit einer Frequenz von 5 AP pro Sekunde feuern einen etwa 10-fach höheren Energiebedarf haben im Vergleich zu nicht feuernden Neuronen (Attwell and Laughlin, 2001). Daher ist eine ausreichend schnelle und genaue Regulation des neuronalen Energiestoffwechsels nötig um das zelluläre ATP Niveau gegen große Schwankungen im ATP Verbrauch zu stabilisieren.

Bisher ist über die Kurzzeitdynamik des zellulären Energiemetabolismus einzelner Neuronen im intakten Gehirn wenig bekannt. Das kommt vor allem daher, dass es experimentell extrem schwierig ist, zeitabhängig Metabolitkonzentrationen und/oder metabolische Flüsse mit einer Auflösung im Sekundenbereich, in dem die metabolischen Adaptionen auftreten, zu bestimmen. Invasive chemische Methoden zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen kommen nicht in Frage. Daher müssen sich experimentelle Untersuchungen auf die wenigen Metabolitkonzentrationen beschränken, die nicht-invasiv und zeitaufgelöst bestimmt werden können, entweder mit optischen Methoden oder funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRI). Daher basiert unser derzeitiges Verständnis der Kurzzeitregulation des neuronalen Energiemetabolismus in vivo fast ausschließlich auf der Interpretation des zeitlichen Verlaufs von gerade mal zwei wichtigen metabolischen Markern. Der eine ist die Sauerstoffkonzentration im Blut einer bestimmten Hirnregione, die durch den so genannten BOLD-Kontrast sichtbar gemacht werden kann. Dieser macht sich den Unterschiede in den magnetischen Eigenschaften zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin zu Nutze. Der andere Marker ist das zelluläre Redoxpotential, das durch die Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide NAD(P)H angezeigt wird. Beide Methoden erlauben es allerdings lediglich relative Änderungen in den Metabolitkonzentrationen anstelle von absoluten Konzentrationen zu bestimmen. Außerdem ist die eindeutige mechanistische Interpretation in den Änderungen dieser metabolischen Marker aus verschiedenen Gründen schwierig: (i) Die Änderung der Sauerstoffkonzentration im Blut setzt sich aus zwei verschiedenen Anteilen zusammen: einem erhöhten Sauerstoffverbrauch von aktivierten Hirnzellen und einer besseren Versorgung aufgrund eines erregungsinduzierten höheren cerebralen Blutflusses (hämodynamische Response) (Arthurs and Boniface, 2002; Devor et al., 2011). (ii) Eine Verminderung der zellulären NAD(P)H Fluoreszenz wie sie direkt nach elektrischer Stimulation beobachtet wird, kann auf verschiedene Art und Weise interpretiert werden: als Ergebnis einer höheren Verbrauchsrate durch die Atmungskette, einer verminderten Produktion durch den Zitratzyklus (TCAC), einer niedrigeren Produktionsrate durch die Glykolyse oder eines erhöhten Verbrauchs der Lactatdehydrogenase (LDH). (iii) Messungen der metabolischen Veränderungen in kleinen Hirnregionen stellen lediglich Mittlungen über eine ganze Population von Neuronen dar, die sich möglicherweise zeitabhängig in verschiedenen Aktivitätszuständen befinden. D.h. Messungen von metabolischen Parametern sagen möglicherweise sehr wenig über zellspezifische

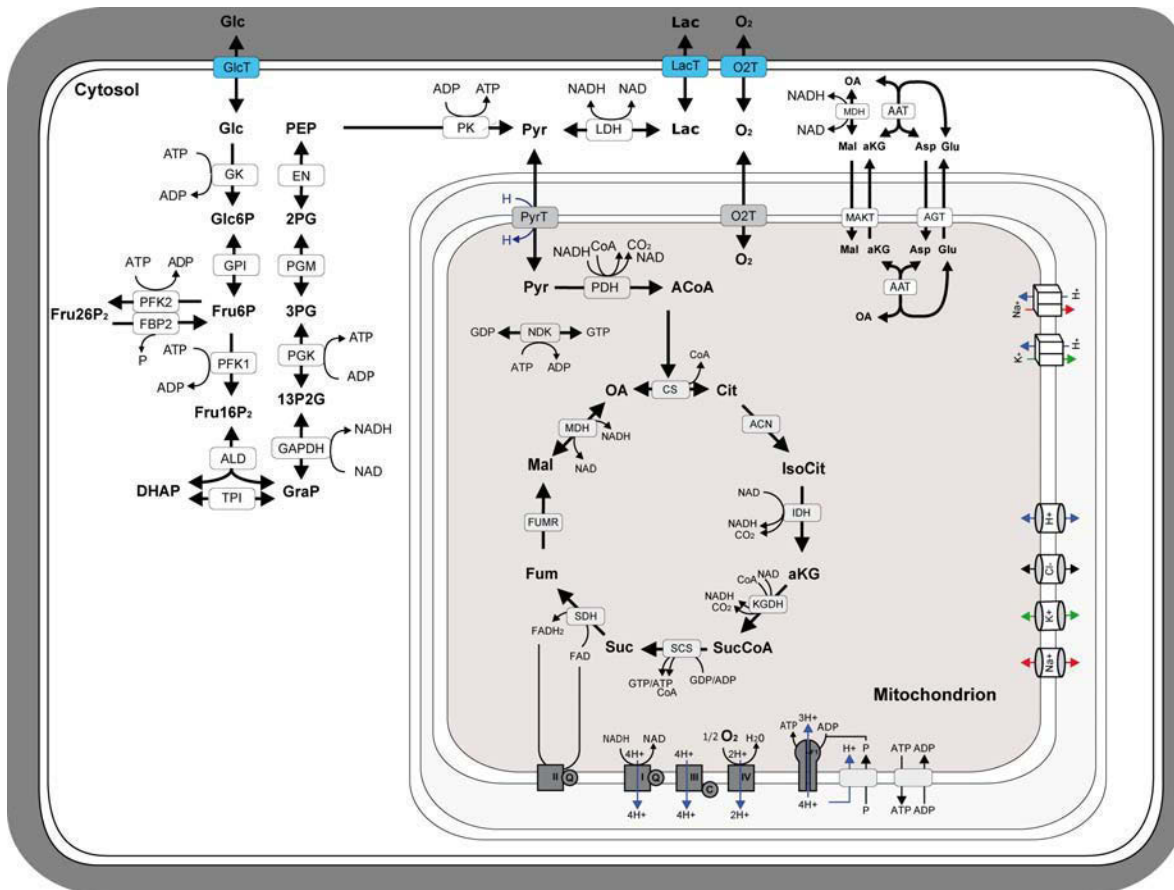
Veränderungen. Zum Beispiel wurde in früheren Untersuchungen von Schultz und Lowenstein (Schultz and Lowenstein, 1978) herausgefunden, dass sich der ATP Gehalt in Hirngewebe von Ratten nach einem elektrischen Schock von 10 Sekunden um 50 % vermindert. Bestimmung der energiereichen Phosphate im Extrakt vom Rattenhirn während Ischämie und Hypoxie und der anschließenden Erholungsphase zeigten ähnlich dramatische Veränderungen (Yager et al., 1992). Wenn man bedenkt, dass der beobachtete Abfall im ATP ein Mittelwert über verschiedenen Zellen war, ist es durchaus möglich und wahrscheinlich, dass der ATP Abfall in einzelnen Zellen noch gravierender war. (iv) Die metabolischen Änderungen, die im Hirngewebe gemessen werden, werden von verschiedenen Zelltypen (hauptsächlich Neuronen und Gliazellen) mit unbekanntem Anteil und möglicherweise gegensätzlichen Effekten verursacht. Zum Beispiel liefern räumlich aufgelöste zwei Photonenfluoreszenzbilder Hinweise darauf, dass der typische Verlauf der NAD(P)H Fluoreszenz bei elektrischer Stimulation – ein kurzer Abfall (dip), gefolgt von einem längeren Erhöhung gegenüber dem Anfangswert (overshoot) – das Resultat der Überlagerung zweier verschiedener zeitlicher Signale sein könnte, die einerseits von der erhöhten oxidativen Phosphorylierung in Neuronen und andererseits von einer erhöhten glykolytischen Aktivität in Astrozyten herrühren (Kasischke et al., 2004).

Ein immer noch intensiv diskutiertes Thema beim Energiestoffwechsel des Gehirns betrifft die Rolle von Lactat als mögliches Energie lieferndes Substrat für aktive Neuronen. Nach der Astrozyt-Neuron-Lactat-Shuttle (ANLS) Hypothese von Magistretti und Anderen (Pellerin and Magistretti, 2011; Pellerin et al., 2007; Pellerin et al., 1998) verbrauchen aktive Neuronen hauptsächlich Lactat, das von gleichzeitig aktiven Astrozyten stammt. Ein überzeugender experimenteller Beweis für diese Hypothese existiert bisher nicht und es wurden viele Argumente gegen diese These ins Feld geführt (Chih and Roberts, 2003; Chih et al., 2001). Glukose und Lactat können beide als Energie liefernde Substrate in menschlichen Zellen dienen, und manche Zelltypen, wie z.B. die Nierenzellen des proximalen Tubulus oder Kardiomyocyten weisen sogar eine besondere Präferenz für Lactat auf. Sowohl Glukose als auch Lactat liefern zytosolisches NADH und Pyruvat, die dann für die mitochondriale ATP Produktion verwendet werden. Die Frage ist daher, wie sich in Neuronen die relative Anteile von Glykolyse und Lactatdehydrogenase an den Zu- und Abflüsse in den zytosolischen NADH und Pyruvatpool ändern, wenn sich der Verbrauch dieser Metabolite aufgrund von einer höheren oxidativen Phosphorylierungsrate bei erhöhter Aktivität in aktivierten Neuronen ändert.

Ein viel versprechender Weg, um die Unsicherheiten und Mehrdeutigkeiten in der Interpretation metabolischer Messungen zu vermindern, besteht in der Anwendung von mathematischen Modellen. Mechanistische mathematische Modelle stellen ein ideales Werkzeug dar um verfügbares experimentelles Wissen, das zu einzelnen Teilen eines Systems vorhanden ist, in ein kohärentes Bild zu integrieren (integrative Funktion). Zusätzlich kann man mit ihnen Hypothesen über das Systemverhalten bei Veränderungen einzelner Systemkomponenten und Umgebungsgrößen generieren (heuristische Funktion). Daher haben wir ein detailliertes kinetisches Model des neuronalen Energiestoffwechsels entwickelt. Es umfasst die Glykolyse, den Citratzyklus (TCAC), die Atmungskette, die oxidative Phosphorylierung, den Malate-Aspartat-Shuttle für den Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen Zytosol und mitochondrialer Matrix, sowie die elektrophysiologische Kopplung zwischen dem zytosolischen und dem mitochondrialen Kompartiment. Im nachfolgenden beschreiben wir den Modellaufbau, validieren das Modell auf der Grundlage vorhandener metabolischer Daten und zeigen die Ergebnisse von verschiedenen Modellsimulationen, die helfen sollen zwei wichtige Fragen zu beantworten: (1) Wie tragen die beiden ATP generierenden Systeme, die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung, zur Befriedigung des zellulären ATP Bedarf bei wechselnden energetischen Anforderung an die Neuronen bei und welche Folgen ergeben sich aus diesem Wechselspiel für die Interpretation des zellulären

Sauerstoffverbrauchs und der NAD(P)H Konzentration ? (2) Unter welchen Bedingungen ist Lactat in der Lage mit Glukose als Energie lieferndes Substrat zu konkurrieren?

## 4.2 Modellbeschreibung



**Abbildung 4.1: Modellschema:** Das Modell umfasst die Hauptwege des neuronalen Energiestoffwechsels: In der Glykolyse wird Glucose in 10 Reaktionen - der Hexokinase (HK), der Glucosephosphat-Isomerase (GPI), der Phosphofruktokinase 1 (PFK1), der Aldolase (ALD), der Triosephosphat-Isomerase (TPI), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der Phosphoglycerat-Kinase (PGK), der Phosphoglycerat-Mutase (PGM), der Enolase (EN) und der Pyruvat-Kinase (PK) - zu Pyruvat und NADH verstoffwechselt. Diese Endprodukte der Glykolyse können anschließend entweder im Mitochondrium weiter oxidiert werden, oder mittels der Lactatdehydrogenase (LDH) in Lactat umgewandelt werden und die Zelle verlassen. Je nach Zustand der Zelle kann Lactat auch aus dem Extrazellulärraum aufgenommen, durch die LDH in Pyruvat und NADH überführt und im Mitochondrium oxidiert werden. Der Transfer des Wasserstoffs vom NADH ins Mitochondrium geschieht mittels der 4 Reaktionen - der zytosolischen und mitochondrialen Malatdehydrogenase (MDH), der zytosolischen und mitochondrialen Aspartat-Aminotransferase (AAT) - und den zwei Antiportern Malat- $\alpha$ -ketoglutarat-Antiporter (MAKT) und Aspartat-Glutamat-Antiporter (AGT) des Malat-Aspartat-Shuttles. Im Mitochondrium wird Pyruvat mittels der Pyruvatdehydrogenase (PDH) und den 8 Reaktionen des Zitratzyklus - der Citrat-Synthase (CS), der Aconitase (AC), der Isocitratdehydrogenase (IDH), des  $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenasekomplexes (KGDHC), der Succinyl-CoA-Synthetase (SCS), der Succinatdehydrogenase (SDH), der Fumerase (FUM) und der MDH - zu CO<sub>2</sub> und NADH verstoffwechselt. Das NADH wird dann in den 3 Reaktionen der Atmungskette (RC) -Komplex I, Komplex III und Komplex IV - in den Protonengradienten überführt. Der Protonengradient wird von den mitochondrialen Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> Pumpen und der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase für das Aufrechterhalten der mitochondrialen Ionenhomeostase und die Erzeugung von mitochondrialen ATP genutzt. Mitochondriales ATP wird mittels des Adeninnukleotidtranslokators (ADNT) mit zytosolischen ATP ausgetauscht.



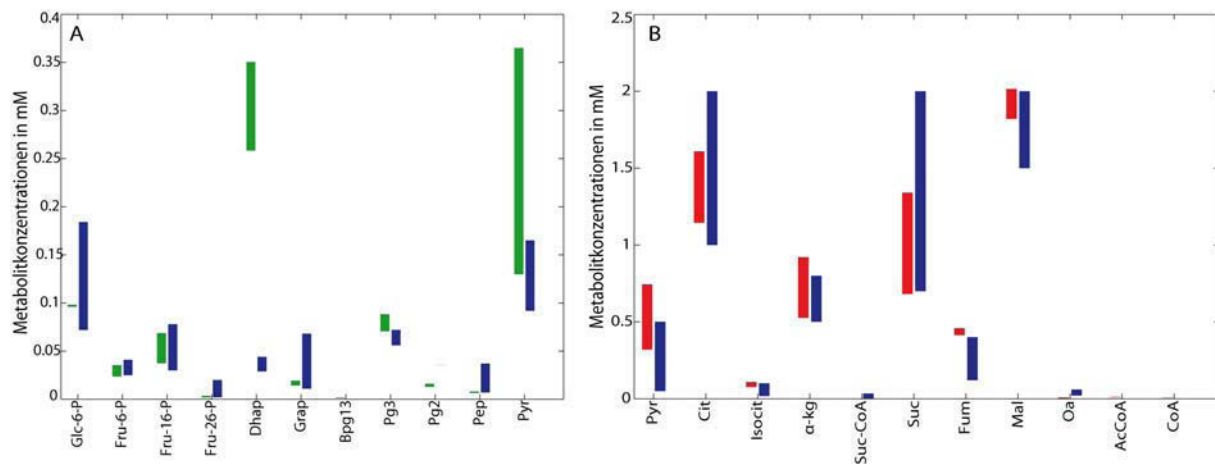
Die enzymatischen Reaktionen und Membrantransportprozesse die Teil des Modells sind sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Im Wesentlichen beinhaltet das Modell die zwei alternativen ATP erzeugenden metabolischen Wege, die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Zusätzlich dient Kreatinphosphat als schnell mobilisierbarer Energiespeicher, indem es seine energiereiche Phosphatgruppe auf ADP überträgt, was durch die Kreatinkinase MB (muscle/brain) katalysiert wird. Glykolyse und OXPHOS sind über verschiedene Metabolite miteinander verbunden und wechselseitig reguliert. Die Purinnukleotide ATP und ADP dienen sowohl als Substrate als auch als allosterische Regulatoren für einige glykolytische Enzyme und sind außerdem Substrate für den mitochondrialen Adeninnukleotidtranslokator und die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. AMP, das aus ADP mittels der Adenylatkinase entsteht, ist ein sensibler Gradmesser für den Energiestatus der Zelle, da der Anstieg der AMP Konzentration auf nichtlineare Art mit dem Abfall der ATP Konzentration verbunden ist. Phosphorylierung des Enzyms Phosphofruktokinase 2 (PFK-2) durch die AMP abhängige Kinase (AMPK) erhöht die Konzentration von Fruktose-2,6-Bisphosphat, dem stärksten Aktivator der Phosphofruktokinase 1 (PFK-1). Die Pyridinnukleotide NAD und NADH sind die Kofaktoren des Glykolyseenzyme Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) und der Lactatdehydrogenase (LDH). Sie sind auch an mehreren Reaktionen des TCAC, des Malat-Aspartat-Shuttles und von Komplex I der Atmungskette beteiligt. Der zytosolische und mitochondriale NAD/NADH Pool sind durch Shuttlesysteme in der inneren Mitochondrienmembran miteinander verbunden. In Neuronen, die hauptsächlich die oxidative Phosphorylierung zur Herstellung von ATP benutzen, ist Pyruvat die Hauptquelle für das mitochondriale Acetyl-CoA, das erforderlich ist, um Zitrat herzustellen. Pyruvat kann entweder durch die Glykolyse aus Glukose oder aus extrazellulärem Lactat durch die Lactatdehydrogenase entstehen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase hängt von der mitochondrialen Konzentration ihrer Substrate ADP, Phosphat und ATP ab. Für eine angemessene Modellierung all dieser Prozesse war es notwendig, ein detailliertes Modell der Glykolyse, des TCAC, des Malat-Aspart-Shuttles, der Atmungskette und der Transportprozesse für Ionen über die innere mitochondriale Membran aufzustellen. Die zeitlichen Änderungen in den 65 Modellvariablen werden mittels gewöhnlicher Differentialgleichungen beschrieben. Elektrodifffusion über die innere mitochondriale Membran wird durch kinetische Gleichungen von Goldman-Hodgkin-Katz-Typ (Berndt et al., 2011) beschrieben, die Komplexität des Atmungskettenmodells wurde im Vergleich zu (Berndt et al., 2012) reduziert. Alle Ratengleichungen und die zugehörigen kinetischen Parameter wurden für Neuronen oder gewebespezifisch fürs Gehirn ausgewählt, so wie man sie in der Literatur finden kann (siehe Anhang zu Kapitel 4).

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Kalibrierung des Modells und definieren des Referenzzustandes

Metabolische Messungen im Hirngewebe mitteln methodisch bedingt über die Signale von vielen Neuronen und anderen Zelltypen. Da die genaue metabolische Ausstattung und der Erregungszustand dieser Zellen nicht bekannt sind, definieren wir ein generisches Neuron, dessen Metabolismus das durchschnittliche Verhalten der gesamten Population des Gewebes darstellen soll. Das generische Neuron erhält keinen externen afferenten Input, wie z.B. optische oder visuelle Stimulation, feuert aber spontan APs mit niedriger Frequenz (~ 1Hz). Es entspricht damit einem Neuron im mittleren Aktivitätszustand, wie es in Kapitel 3 betrachtet wurde. Da zu einem gegebenen Zeitpunkt weniger als 10 % aller Neuronen im Gehirn aktiv sind (Laughlin et al., 1998; Lennie, 2003), widerspiegelt der Referenzzustand die

Schlüsseleigenschaften, die für das gesamte Gehirn gemessen wurden: (i) Das Glukose zu Sauerstoff Aufnahmeverhältnis beträgt etwa 5.5 (Madsen et al., 1999; Powers et al., 2008; Yager et al., 1992). (ii) ein kleiner Anteil (< 10 %) der Glukose wird in Lactat umgewandelt und exportiert (Quistorff et al., 2008), (iii) ~50 % des Energieverbrauchs im Referenzzustand entfällt auf die basalen Bedürfnisse der Zelle (für Proteinsynthese, Ouabain-insensitive Membrantransporte, usw.) und ~50 % des Energieverbrauches entfällt auf die Na-K-ATPase (Lennie, 2003), die für sekundär aktive Prozesse notwendig ist, indem sie die Ionengradienten und das Membranpotetnial aufrecht erhält und gegen Störungen durch AP stabilisiert.



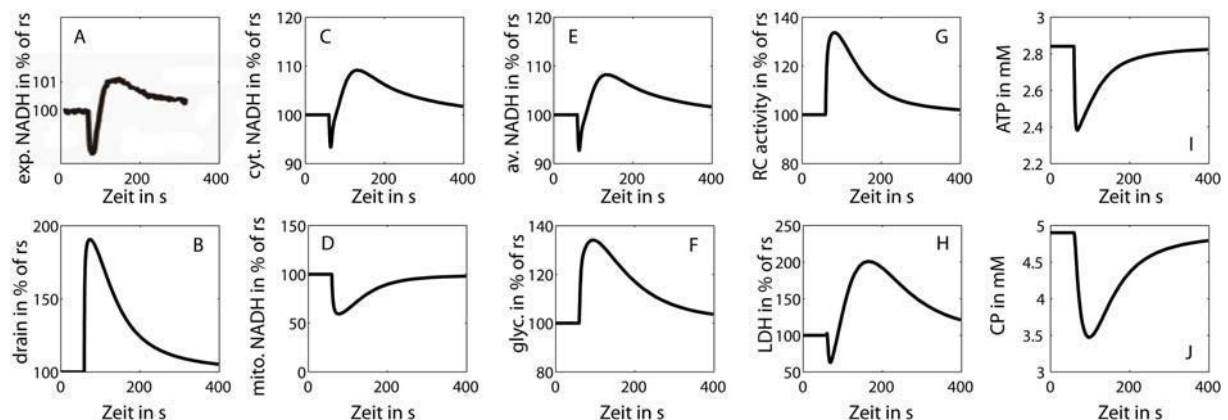
**Abbildung 4.2: Vergleich der simulierten mit den experimentell bestimmten Konzentrationen von Metaboliten der Glykolyse und des TCAC.** Die blauen Balken zeigen die experimentelle bestimmten Konzentrationsbereich der Metabolite der Glykolyse (Ambrosio et al., 1991; Gimenez et al., 1974; Gorell et al., 1977; Hoyer and Krier, 1986; Kasten and Dunaway, 1993; Kasten et al., 1993; Merrill and Guynn, 1976; Miller and Corrdry, 1981; Sacktor et al., 1966; Szutowicz et al., 1975; Vannucci and Brucklacher, 1994; Vora et al., 1985; Yamamoto et al., 1990; Zwingmann et al., 2004) und des TCAC (Benzi et al., 1979; Brown and Brand, 1988; Folbergr.J et al., 1974; Gibala et al., 1998; Gorell et al., 1977; Hansford and Johnson, 1975; Simpson and Angielsk.S, 1973; Smith et al., 1974). Die grünen und roten Balken zeigen die simulierten Konzentrationsspannen in den Metaboliten bei Variieren der energetischen Belastung zwischen Normalzustand und hoher energetischer Belastung (Gammaoszillation).

Wir benutzen die maximalen Enzymaktivitäten ( $V_{\max}$ -Werte) als anpassbare Parameter. Sie wurden so eingestellt, dass die obigen globalen Eigenschaften, sowie gemessene Metabolitkonzentrationen, Ionenkonzentrationen und das mitochondrialen Membranpotential richtig wiedergegeben werden (siehe Anhang zu Kapitel 4). Abbildung 4.2 zeigt die gute Übereinstimmung zwischen den simulierten und den gemessenen Metabolitkonzentrationen der Glykolyse (Abbildung 4.2 A) und des TCAC (Abbildung 4.2 B) in verschiedenen Aktivitätszuständen des Neurons. Die einzige wirkliche Abweichung weist die simulierte gegenüber der gemessenen DHAP-Konzentration auf. Das liegt an einem Missverhältnis zwischen dem gemessenen DHAP:Grap Verhältnis im Vergleich zur Gleichgewichtskonstante der Triosephosphatisomerase. Daraus kann man entweder auf Messfehler schließen oder man folgert, dass Mikrokompartimentierung oder metabolisches Shutteln an den niedrigen experimentell bestimmten Dhap Konzentrationen schuld sind.

### 4.3.2 Modellbasierte Interpretation der zeitlichen NAD(P)H Profile während verschiedenen Aktivitätszuständen in hippocampalen Hirnschnitten

Als nächstes haben wir unser Modell dazu benutzt, um die zeitabhängigen Änderungen im Energiemetabolismus von neuronalen Zellen, die durch einen höheren ATP Verbrauch ( $v_{ATPase}$ ) ausgelöst wurden, zu simulieren. Die Simulationsergebnisse haben wir dann mit den gemessenen NAD(P)H Fluoreszenzkurven, die in hippocampalen Hirnschnitten von Mäusen aufgenommen wurden, verglichen. In diesen Experimenten wurden die Zeitverläufe der NAD(P)H Fluoreszenz bei induzierten Aktivitätszustandsänderungen im Hirnschnitt kontinuierlich aufgenommen. Die Aktivitätszustandsänderungen wurden entweder durch elektrische Stimulation oder durch Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin erreicht. Die Netzwerkaktivität der Hirnschnitte wurde über elektrophysiologische Parameter gemessen. Für mehr Details der experimentellen Methoden verweisen wir auf den Methodenteil in (Huchzermeyer et al., 2008).

#### 4.3.2.1 Störung der spontanen Netzwerkaktivität durch kurzzeitige elektrische Stimulation



**Abbildung 4.3: NADH Fluoreszenz bei elektrischer Stimulation des Ruhezustandes.** Die Simulationen wurden mit der Aktivierungsfunktion in (B) durchgeführt. (C) und (D) zeigen die daraus resultierenden relativen Konzentrationsänderungen des zytosolischen und mitochondrialen NADH. Der gewichtete Mittelwert, der mit der gemessenen Fluoreszenz (A) (Holzhütter and Kann, 2008), zu vergleichen ist, ist in (E) dargestellt. (F) und (G) zeigen die Aktivitäten der Glykolyse und der Atmungskette (RC). Die Aktivität der Lactatdehydrogenase ist in (H) dargestellt. Paneele (I) und (J) zeigen die sich mit der Aktivierungsfunktion (B) ergebenden Konzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und Creatinphosphat (CP).

Hippocampale Hirnschnitte, die anfänglich spontane Netzwerkaktivität aufwiesen, wurden für 10 Sekunden mit einem elektrischen Impuls von 20 Hz gereizt. Der typische Zeitverlauf einer solchen Messung der NAD(P)H Fluoreszenz (Holzhütter and Kann, 2008) ist in Abbildung 4.3 A dargestellt. Er weist ein biphasisches Verhalten auf, bestehend aus einem Dip von 10-20 Sekunden und einem darauf folgendem Overshoot, der deutlich länger anhält als die

Stimulusdauer und mit einer Halbwertszeit von etwa 80 Sekunden zerfällt. Ähnliche Muster der NAD(P)H Fluoreszenz wurden in vielen anderen Experimenten mit Hirnschnitten, die mit elektrischen Impulsen (Shuttleworth et al., 2003) oder durch die Zugabe von exzitatorischen Neurotransmittern (Gleichmann et al., 2009; Requardt et al., 2010) stimuliert wurden, beobachtet.

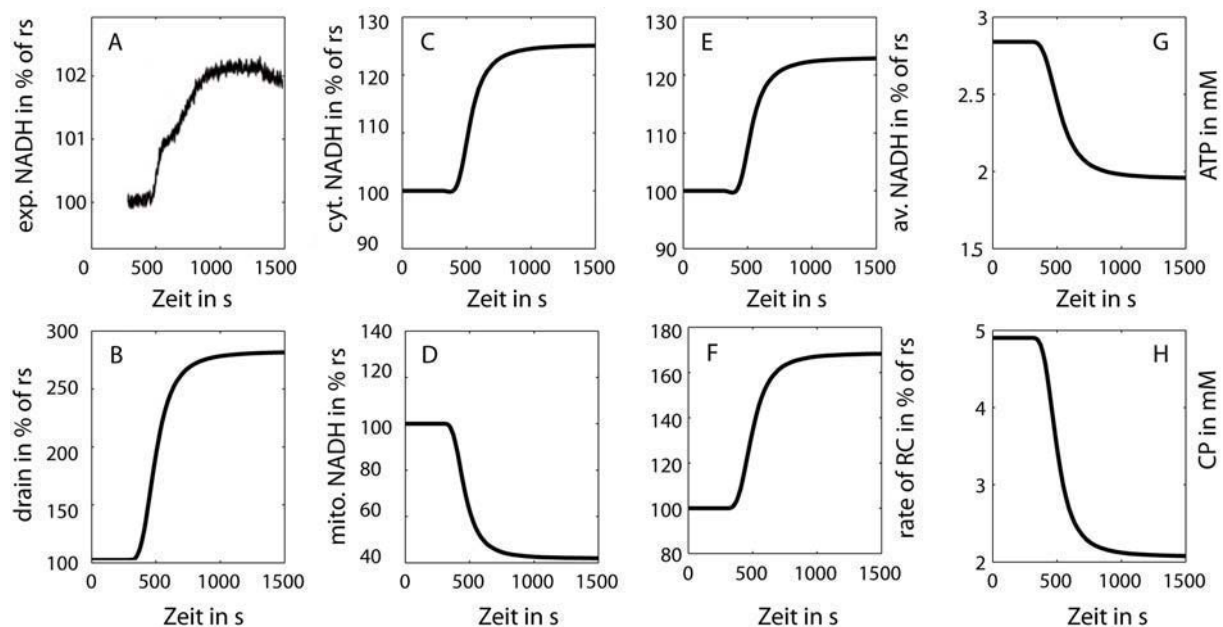
Für die modellbasierten Simulationen dieser Experimente wurden die zeitabhängigen Veränderungen in der Aktivität der Na-K-ATPase durch die Aktivierungsfunktion in Abbildung 4.3 B beschrieben. Diese spiegelt die neuronale Reaktion auf den elektrischen Reiz wider. Der maximale Anstieg des gesamten Energiebedarfs betrug 45 %, was einem 90 % Anstieg in der Aktivität der Na-K-ATPase entspricht.

Um die zeitabhängigen Simulationsergebnisse besser verständlich zu machen, fassen wir kurz die der metabolischen Response zugrunde liegenden Mechanismen bei erhöhtem zytosolischen ATP Verbrauchs zusammen. Zytosol: ATP ↓, ADP ↑, AMP ↑ → PFK-1 ↑, PFK-2 ↑, → G6P ↓ → HK ↑ → erhöhte Glykolyserate → NADH ↑, NAD ↓. Mitochondrium: ADNT ↑ → ATP ↓, ADP ↑ → F0F1-ATPase ↑ → RC ↑, → NADH ↓, NAD ↑ → NAD abhängige TCAC Enzyme ↑. Daraus folgt, dass direkt nach Einsetzen des Stimulus die Glykolyse und OXP auf entgegengesetzte Art und Weise auf das NADH-Signal wirken. Da der zytosolische und der mitochondriale NADH-Pool mittels der Shuttlesysteme miteinander verbunden sind, hängt der Gesamteffekt außer von den Poolgrößen auch von der Stärke der Kopplung und der Trägheit der Subsysteme ab. Wenn der Abfall im mitochondrialen NADH schnell und stark ist, kann der damit über die Shuttlesysteme einhergehende Sog am zytosolischen NADH schneller sein als die etwas verzögert reagierende Glykolyse und damit zu einem kurzzeitigen Abfall im zytosolischen NADH führen (Dip).

Tatsächlich zeigen in den Simulationen sowohl die mitochondriale, als auch die zytosolische NADH Konzentration einen schnellen Abfall, der im Mitochondrium allerdings sehr viel stärker ist (im Vergleich zum Ausgangszustand um die 50 %) als im Zytosol. Der Abfall im mitochondrialen NADH kommt aufgrund des plötzlich stark ansteigenden Verbrauchs von NADH durch die Atmungskette zustande. Die daraus resultierende Aktivierung des Malat-Aspartat-Shuttles reduziert die zytosolischen NADH Konzentration. Das Auffüllen des Pools durch die Glykolyse findet hingegen etwas verzögert statt, da sich die glykolytischen Intermediate erst ansammeln müssen. Folglich dominiert der Verbrauch von zytosolischem NADH durch das Shuttlesystem anfänglich die erhöhte NADH Produktion durch die Glykolyse. Das Resultat ist ein anfänglicher Dip im zytosolischen NADH. Der relative Abfall im zytosolischen NADH ist jedoch wesentlich geringer als im Mitochondrium, da der zytosolische NADH Pool viel größer ist als der mitochondriale (in unserem Modell etwa 10:1). Mitochondriales NADH bleibt während der gesamten Dauer des erhöhten Energiebedarfs erniedrigt. Dieses Verhalten des mitochondrialen NADH Spiegels stimmt mit Messungen an isolierten Mitochondrien bei verschiedenen energetischen Belastungen (Tretter and Adam-Vizi, 2000) überein. Im Gegenzug dazu weist der zytosolische NADH Spiegel eine Erhöhung auf, der aufgrund des gesunkenen zytosolischen Phosphorylierungspotentials und der damit einhergehenden Aktivierung der HK, PFK und PK zustande kommt. Der erhöhte Fluss durch die Glykolyse geht selbstverständlich mit einer erhöhten Glukoseaufnahme einher (Abbildung 4.3 F), die etwas höher ausfällt als die Zunahme im Sauerstoffverbrauch. Folgerichtig sagt das Model eine Erhöhung der LDH Aktivität und eine Erhöhung der Lactatbildung voraus, der jedoch ein kleiner Dip direkt nach dem Beginn der Stimulation voraus geht (Abbildung 4.3 H). Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen (Hu and Wilson, 1997). In unserem Modell erklärt sich die erhöhte Aktivität der LDH damit, dass sie die einzige zytosolische Reaktion darstellt, die das überschüssige glykolytische NADH zu NAD oxidiert und somit die Reaktionsfähigkeit der Glyceraldehyddehydrogenase (GAPDH) aufrechterhält.

Die beobachtete NADH Fluoreszenz ist proportional zum gesamten NADH Inhalt der Zelle, der durch  $\text{NADH}_{\text{tot}} = \Omega_{\text{cyt}} [\text{NADH}_{\text{cyt}}] + \Omega_{\text{mito}} [\text{NADH}_{\text{mito}}] \approx \Omega_{\text{cyt}} [\text{NADH}_{\text{cyt}}]$ , da  $\Omega_{\text{cyt}} \gg \Omega_{\text{mito}}$  gegeben ist. Die beobachtete Fluoreszenz spiegelt also vor allem den zytosolischen Anteil wider. Der zeitliche Verlauf der simulierten gesamten NADH Konzentration (Abbildung 4.3 E) befindet sich in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Zeitverlauf der NADH Fluoreszenz (Abbildung 4.3 A). Während die gemessenen Fluoreszenzänderungen normalerweise in der Größenordnung von 1-2 % liegen, sind die simulierten Änderungen etwa um einen Faktor 10 größer. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise damit erklären, dass ~90 % Fluoreszenzsignals von proteingebundenem NADH kommt und einem damit einen Fluoreszenzhintergrund liefert (Blinova et al., 2004; Vishwasrao et al., 2005). Bezüglich der Änderungen des Phosphorylierungspotentials während dieser Art der Aktivierung, sagt das Model einen moderaten Abfall von 15 % im ATP und von 35 % im Kreatinphosphat vorher.

#### 4.3.2.2 Übergang zwischen spontaner Netzwerkaktivität und Gammaoszillation



**Abbildung 4.4:** Simulierte NADH Konzentrationen beim Übergang vom Ruhezustand zu Gammaoszillationen. Die Simulationen wurden mit der Aktivierungsfunktion in (B) durchgeführt. (C) und (D) zeigen die daraus resultierenden relativen Konzentrationsänderungen des zytosolischen und mitochondrialen NADH. Der gewichtete Mittelwert, der mit der gemessenen Fluoreszenz (A) (Kann et al., 2011), zu vergleichen ist, ist in (E) dargestellt. (F) zeigt die Aktivitäten der Atmungskette (RC). Paneele (G) und (H) zeigen die sich mit der Aktivierungsfunktion (B) ergebenden Konzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und Creatinphosphat (CP).

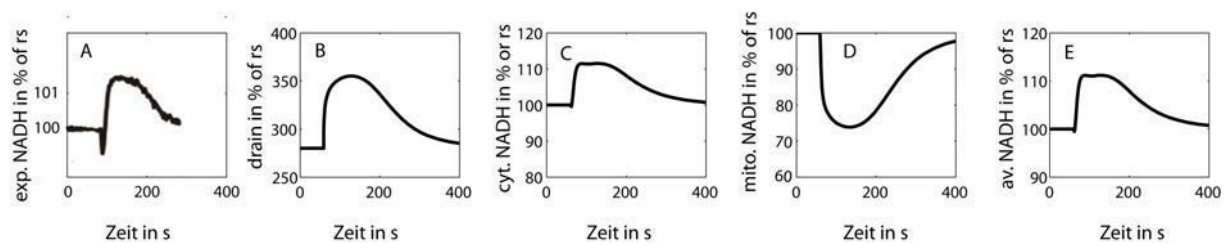
Hippocampale Hirnschnitte, die spontane Netzwerkaktivität aufwiesen, wurden durch Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin zu Gammaoszillationen angeregt, einem Zustand hohen Energieverbrauches. Ein typischer Zeitverlauf einer NAD(P)H Fluoreszenzmessung für einen solchen Übergang ist in Abbildung 4.4 A dargestellt (Kann et al., 2011). Er weist keinen anfänglichen Dip auf, d.h. die Fluoreszenz steigt von Beginn an.

Für die modellgestützten Simulationen dieses Experiments wurde die zeitabhängige Aktivität der Na-K-ATPase, als Reaktion auf den Acetylcholin induzierten Übergang von der Spontanaktivität zu Gammaoszillationen, mit der Aktivierungsfunktion in Abbildung 4.4 B simuliert. In Kapitel 3 haben wir gezeigt, dass der Sauerstoffverbrauch in Schnitten mit Gammaoszillationen im Vergleich mit spontan aktiven Schnitten etwa 1.5-2-mal höher.

Dementsprechend wurde die Aktivierungsfunktion so gewählt, dass der Sauerstoffverbrauch der Zellen im neuen stationären Zustand etwa um 70 % erhöht ist.

Der von unserem Modell vorhergesagte Abfall von ATP und KrP beträgt jeweils 35 % und 60 %. Die zeitlichen Verläufe von zytosolischem und mitochondrialen NADH weisen beide einen monotonen Verlauf auf: zytosolisches NADH steigt an und mitochondriales NADH fällt ab, bis sie ein neues stationäres Niveau erreichen. Aufgrund des langsam ansteigenden ATP Bedarfs und des zeitgleiche Anstieg der TCAC Aktivität kommt es nicht zu einem plötzlichen Abfall im mitochondrialen NADH Pool und auch nicht zu einer plötzlichen Abnahme des zytosolischen NADH durch das Malat-Aspartat-Shuttle. Die Glykolyse reagiert aufgrund des langsam steigenden Energiebedarfs im Vergleich zur OXP auch nicht verzögert. Genau wie bei der elektrischen Stimulierung vorher, ist der Anstieg im zytosolischen NADH eine Konsequenz der durch das verminderte Phosphorylierungspotential aktivierten Glykolyse. Deren Aktivierung ist stärker als die des TCAC und der OXP. Wie vorher stimmen die simulierten und beobachteten Zeitverläufe für die NAD(P)H Fluoreszenz gut überein (siehe Abbildung 4.4 A und 4.4 E).

#### 4.3.2.3 Störung der Gammaoszillation durch kurzzeitige elektrische Stimulation



**Abbildung 4.5: Simulierte NADH Konzentration bei zusätzlicher elektrischer Stimulation während Gammaoszillationen.** Die Simulationen wurden mit der Aktivierungsfunktion in (B) durchgeführt. (C) und (D) zeigen die daraus resultierenden relativen Konzentrationsänderungen des zytosolischen und mitochondrialen NADH. Der gewichtete Mittelwert, der mit der gemessenen Fluoreszenz (A), zu vergleichen ist, ist in (E) dargestellt.

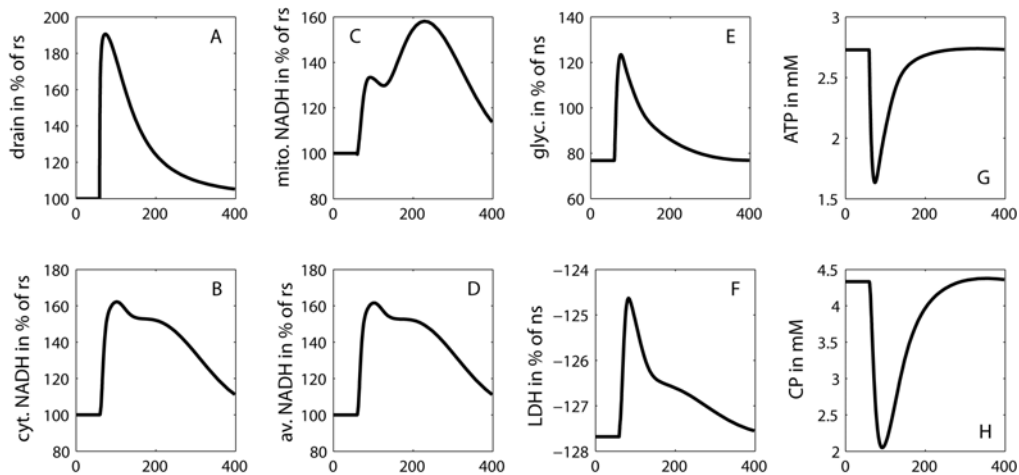
Hippocampale Hirnschnitte, die stabil Acetylcholin induzierte Gammaoszillationen ausführen, wurden zusätzlich für 10 Sekunden mit einem elektrischen Puls von 20 Hz gereizt. Der Zeitverlauf einer typischen Messung der relativen NAD(P)H Fluoreszenz (Holzhütter and Kann, 2008) ist in Abbildung 4.5 A dargestellt. Sie weist im Vergleich zur elektrischen Reizung bei Spontanaktivität einen sehr viel geringeren Dip auf (der bei einigen Messungen auch ganz verschwinden kann), und einen klaren Overshoot mit langsam abfallender Flanke.

Der Ausgangszustand für die Simulation dieses Experiments ist die Gammaoszillation, in dem der ATP Verbrauch des Schnittes im Vergleich zur Spontanaktivität bereits mehr als verdoppelt ist. Die relativen Änderungen in Abbildung 4.4 C - 4.4 E beziehen sich auf diesen neuen Zustand. Der zusätzliche ATP Verbrauch aufgrund der elektrischen Reizung wurde mit einer ähnlichen Aktivierungsfunktion modelliert wie bei der Störung der spontanen Netzwerkaktivität durch kurzzeitige elektrische Stimulation. Obwohl der relative Abfall im mitochondrialen NADH mit 25 % noch sehr deutlich ausfällt, ist der absolute Anteil deutlich geringer als bei der elektrischen Störung der spontanen Netzwerkaktivität. Dass der zusätzliche mitochondriale NADH Verbrauch sehr viel geringer ist liegt daran, dass sich der Schnitt bereits vor der elektrischen Reizung in einem Zustand befindet, für dessen Aufrechterhaltung sehr viel Energie bereitgestellt werden muss. In diesem Zustand ist die Atmungskette bereits fast vollständig aktiviert und kann durch zusätzlichen Energiebedarf nur noch minimal stimuliert werden. Der im Vergleich zur Störung der spontanen Netzwerkaktivität sehr viel kleinere Abfall im mitochondrialen NADH führt zu einer sehr viel



geringeren Aktivierung des Malat-Aspartat-Shuttles und daher zu einem sehr viel kleineren (oder verschwindenden) Dip im zytosolischen NADH. Die Fähigkeit der Atmungskette, ihre Aktivität bei einem plötzlichen Anstieg im Energiebedarf zu steigern, bestimmt die Größe des Dips. Bei der elektrischen Reizung von Schnitten, die Gammaoszillationen ausführen, zeigen unsere Simulationsergebnisse also einen kleinen bzw. verschwindenden Dip und einen deutlichen Overshoot (die Glykolyse kann im Gegensatz zur OXP noch gesteigert werden), in Übereinstimmung mit den experimentell gemessenen Zeitverläufen der NAD(P)H Fluoreszenz.

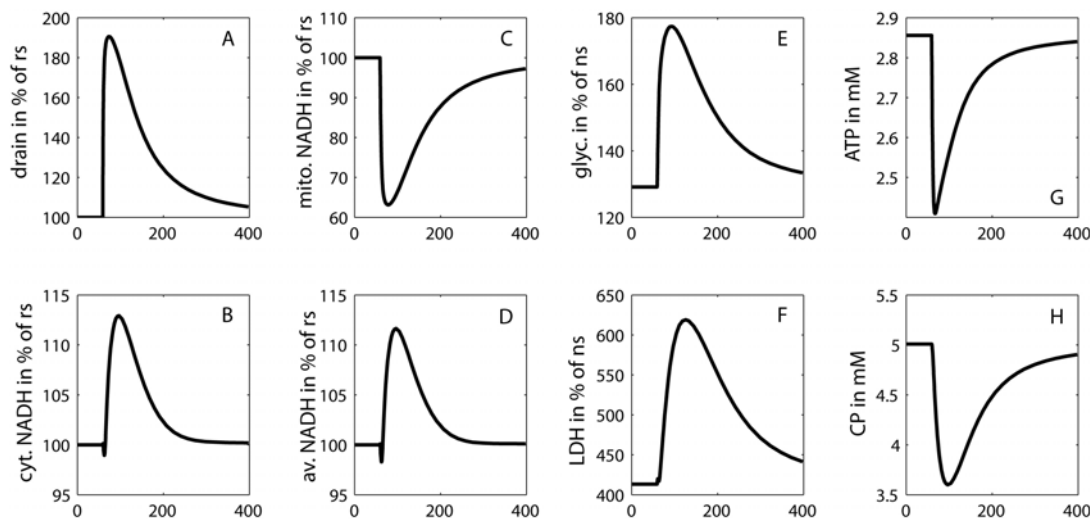
### 4.3.3 Simulation der durch elektrische Reizung ausgelösten metabolischen Response bei veränderter glykolytischer Kapazität



**Abbildung 4.6:** *NADH Konzentration bei elektrischer Stimulation im Ruhezustand mit reduzierter Glykolysekapazität.* Die Kapazität der glykolytischen Enzyme wurde auf 66 % des Wertes vermindert, der in den Simulationen der vorigen Abschnitte zugrunde gelegt wurde. Die Simulationen wurden mit der Aktivierungsfunktion in (A), welche identisch mit der in Abbildung 4.3 B ist, durchgeführt. (B) und (C) zeigen die daraus resultierenden relativen Konzentrationsänderungen des zytosolischen und mitochondrialen NADH. Der gewichtete Mittelwert ist in (D) dargestellt. (E) und (F) zeigen die relativen Aktivitäten der Glykolyse und Lactatdehydrogenase (LDH) im Vergleich zum Ruhezustand mit 100 % Glykolysekapazität (Abschnitt 4.3.2.1). Paneele (G) und (H) zeigen die sich mit der Aktivierungsfunktion (B) ergebenden Konzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und Creatinphosphat (CP).

Die Simulationen in Abschnitt 4.3.2 wurden für ein generisches Neuron mit einer glykolytischen Kapazität ausgeführt, die es erlaubt, dass im Grundzustand ein kleiner Teil der Glykose (< 10 %) nicht oxidiert, sondern in Lactat überführt wird und in den Extrazellulärraum abgegeben wird (Powers et al., 2007). Messungen der regionalen Verteilung der aeroben Glykolyse weisen jedoch in verschiedenen Hirnarealen beim Menschen große Unterschiede auf (Vaishnavi et al., 2010). Zusätzlich variiert die Mitochondriendichte zwischen verschiedenen Neuronentypen und sogar innerhalb einer einzelnen Zelle. So gibt es z.B. kaum Mitochondrien im Dornfortsatz von Dendriten (Li et al., 2004), im Gegensatz zu Axonen (Cai and Sheng, 2009). Daher haben wir untersucht, wie sich die metabolische Response gegenüber einer Erhöhung des Energieverbrauchs bei veränderter glykolytischer Kapazität verhält. Dafür veränderten wir die maximale Kapazität aller Glykolyseenzyme unseres generischen Neurons auf 66 % (Abbildung 4.6) und 133 % (Abbildung 4.7) ihres Ursprungswertes. Die externen Bedingungen und der Energiebedarf des Referenzzustandes blieben dabei unverändert. Diese Änderungen führen zu einem neuen metabolischen stationären Zustand mit veränderter Glykoseaufnahme und veränderten

glykolytischen Fluss. Im ersten Fall (verminderte Glykolysekapazität) muss das Neuron nun zusätzlich Lactat aus dem Extrazellulärraum aufnehmen, da die Glykolysekapazität nicht mehr ausreicht um allein mit der Umwandlung von Glykose in Pyruvat den Fluß im TCAC aufrecht zu erhalten, der für die ATP-Bildung notwendigen Fluß ist. Abbildung 4.6 zeigt den Zeitverlauf einiger ausgewählter Metabolite und Flüsse, die man erhält, wenn man dasselbe Aktivierungsprofil wie in Abschnitt 4.3.2.1 (elektrische Reizung bei Spontanaktivität) zugrunde legt. Es ergeben sich in der Anfangsphase direkt nach dem Beginn der Reizung deutliche Unterschiede in den Zeitverläufen im Vergleich zu denen bei normaler glykolytischer Kapazität. Sowohl die mitochondriale (Abbildung 4.6 B) als auch die zytosolische NADH Konzentration (Abbildung 4.6 C) steigen an und weisen keinen initialen Dip auf. Folglich gibt es auch keinen Dip im Zeitverlauf des gesamten NADH Profils (Abbildung 4.6 D). Die Laktataufnahme nimmt im Vergleich zum nicht gereizten Zustand nicht weiter zu, sondern marginal ab (Abbildung 4.6 F). Das liegt daran, dass, wie in Abschnitt 4.3.2.1 bereits diskutiert, die Glykolyse stärker aktiviert wird als die OXP und daher mehr Pyruvat und NADH für den TCAC zur Verfügung stellt (Abbildung 4.6 E).



**Abbildung 4.7: NADH Konzentration bei elektrischer Stimulation im Ruhezustand mit erhöhter Glykolysekapazität.** Die Kapazität der glykolytischen Enzyme wurde auf 133 % erhöht. Die Simulationen wurden mit der Aktivierungsfunktion in (A), welche identisch mit der aus Abbildung 4.3 B ist, durchgeführt. (B) und (C) zeigen die daraus resultierenden relativen Konzentrationsänderungen des zytosolischen und mitochondrialen NADH. Der gewichtete Mittelwert ist in (D) dargestellt. (E) und (F) zeigen die relativen Aktivitäten der Glykolyse und Lactatdehydrogenase (LDH) im Vergleich zum Ruhezustand mit 100 % Glykolysekapazität (Abschnitt 4.3.2.1). Paneele (G) und (H) zeigen die sich mit der Aktivierungsfunktion (B) ergebenden Konzentrationen der energiereichen Phosphate ATP und Creatinphosphat (CP).

Im zweiten Fall, bei dem die Glykolysekapazität im Vergleich zur OXP Kapazität des Neurons stark erhöht ist, geben die Zellen bereits im Grundzustand viel Lactat in den Extrazellulärraum ab. Abbildung 4.7 zeigt die simulierten Zeitverläufe für ausgewählte Metabolite und Flüsse, die man erhält, wenn man wiederum dasselbe Aktivierungsprofil wie in Abschnitt 4.3.2.1 (elektrische Reizung bei Spontanaktivität) zugrunde legt. Das allgemeine Verhalten ist sehr ähnlich zu dem in Abschnitt 4.3.2.1, da aber der glykolytische Fluss höher ist fällt der Abfall des zytosolischen NADH infolge des aktivierten Malat-Aspartat-Shuttles kleiner aus. Daher ist auch der Dip im glykolytischen NADH-Verlauf und somit im gesamten NADH-Verlauf kleiner.

Aus diesen Simulationen schließen wir, dass (i) die Eigenschaft eines Neurons Lactat aufzunehmen oder abzugeben von seiner glykolytischen Kapazität relativ zur Kapazität der OXP abhängt, (ii) eine Erhöhung der Laktataufnahme als Reaktion auf einen erhöhten



Energiebedarf nur bei einer sehr geringen glykolytischen Kapazität oder unter starker Glukoseverarmung im Extrazellulärraum auftritt, wenn Laktat sowieso schon im nicht aktivierten Zustand das vorherrschende Substrat ist, und (iii) das Auftreten einer mono- oder biphasischen aktivitätsinduzierten NAD(P)H Fluoreszenz durch das Verhältnis der glykolytischen zur OXP Kapazität in den Zellen, aus denen das untersuchte Gewebe besteht, bestimmt ist. D.h. der Dip ist das Resultat eines transienten Nicht-Gleichgewichts zwischen glykolytischer NADH-Bildung und respiratorischem NADH-Verbrauch.

## 4.4 Diskussion

Das Ziel dieses Kapitels war der Aufbau eines realistischen kinetischen Modells für den neuronalen Energiemetabolismus, das es erlaubt zur Beantwortung kontrovers diskutierter Fragen der Bioenergetik des Gehirns beizutragen: Was sagt uns der Zeitverlauf der NAD(P)H Fluoreszenz über die metabolische Response neuronaler Zellen? Kann Lactat als bevorzugtes Substrat für aktive Neuronen dienen?

Unsere Simulationen legen nahe, dass die gemessenen NAD(P)H Fluoreszenzverläufe hauptsächlich das Verhalten des zytosolischen NADH widerspiegeln. Wir haben gezeigt, dass das Auftreten eines biphasischen NAD(P)H Fluoreszenzsignals von der Kapazität der Glykolyse im Verhältnis zur OXP Kapazität abhängt. Daher könne neuronale Zellen in verschiedenen Regionen des Hirns abhängig von ihrer enzymatischen Ausstattung unterschiedliches charakteristisches Verhalten aufweisen. Dieses Ergebnis kann scheinbar widersprüchliche experimentelle Daten erklären, nach denen der reizungsinduzierte biphasische NAD(P)H Verlauf sowohl an Kulturen von Neuronen (Duchen, 1992) als auch von Astrozyten (Requardt et al., 2010) gemessen wurden. Im Gegensatz dazu geben 2-Photonen-Fluoreszenzmessungen im Gehirn Anlass zu der Auffassung, dass die beiden Zelltypen unterschiedlich reagieren. Neuronen weisen danach eine Abnahme in der NAD(P)H Fluoreszenz auf, wohingegen Astrozyten mit einem verzögerten Anstieg der NAD(P)H Fluoreszenz reagieren. Unsere Simulationen legen nahe, dass das biphasische NAD(P)H Profil nur bei einer plötzlichen Änderung im Energiebedarf auftritt. Bei einem langsamen Anstieg des Energiebedarfs, wie er z.B. beim Acetylcholin induzierten Übergang von Spontanaktivität zu Gammaoszillation in Hirnschnitten auftritt, bleibt der Metabolismus in einem Quasigleichgewichtszustand, so dass die glykolytische Response im Vergleich zur respiratorischen Response der Atmungskette nicht verzögert ist und daher das zytosolische NADH monoton ansteigt.

Unsere Simulationen haben gezeigt, dass Lactat in Situationen, in denen die glykolytische Kapazität der Zelle gering ist, tatsächlich als Energie lieferndes Substrat zusätzliche zur Glukose auftreten kann. Das stimmt mit Experimenten überein, die zeigen, dass Neuronen Lactat verstoffwechseln, wenn keine Glykose zur Verfügung steht (Schurr et al., 1988). Nach unseren Simulationsergebnissen scheint es allerdings sehr unwahrscheinlich, dass ein Anstieg im Energiebedarf der Zelle mit einer erhöhten Verstoffwechslung von Lactat einhergeht. Nach unserem Modell wird die Glykolyse stärker aktiviert als die OXP. Daher sollte eine zusätzliche Verstoffwechslung von Lactat nach Reizung nur in den Zellen eintreten, die schon im nicht aktivierten Zustand hauptsächlich auf Lactat zurückgreifen. Dieses Ergebnis beschränkt die Funktionalität des postulierten Astrozyt-Neuron-Laktat-Shuttles (Pellerin et al., 2007; Pellerin et al., 1998) auf Hirnregionen, in denen Astrozyten mit einer hohen glykolytischen Kapazität ausgestattet sind, wohingegen die benachbarten Neuronen eine sehr geringe glykolytische Kapazität haben und somit unter allen Bedingungen auf Laktat als energielieferndes Substrat zurückgreifen. Aufgrund der ausreichend hohen glykolytischen Kapazität von Neuronen dürften solche Regionen jedoch schwer zu finden sein. Unsere

Simulationen legen eher nahe, dass sowohl Neuronen als auch Astrozyten während erhöhter Aktivität mehr Lactat produzieren. Das angesammelt Lactat kann dann möglicherweise in der Ruhephase von Astrozyten genutzt werden, um ihren geleerten Glykogenpool wieder aufzufüllen ohne auf den Energiemetabolismus von Neuronen Einfluss zu nehmen.

# Kapitel 5: Die Auswirkung einer verminderten $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenase Aktivität auf die ATP-Produktion und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in neuronalen Zellen

## 5.1 Einleitung

Ein Rückgang in der Aktivität des Thiamin-abhängigen Enzymkomplex  $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenase (KGDHC) im Gehirn tritt in zahlreichen altersabhängigen Krankheiten auf (Albers and Beal, 2000; Gibson et al., 2000). Bei Alzheimererkrankungen liegt die Verminderung bei 25-75% (Butterworth and Besnard, 1990; Gibson et al., 1988; Gibson et al., 1998; Mastrogriaco et al., 1993; Terwel et al., 1998) und korreliert stark mit einer verminderten geistigen Leistungsfähigkeit (Bubber et al., 2005). Regionale Unterschiede in der Menge an KGDHC in verschiedenen Hirnregionen (Calingasan et al., 1994; Park et al., 2000) könnte für die regionspezifische Anfälligkeit gegenüber Schädigungen im Gehirn verantwortlich sein. Neurone, die große Mengen KGDHC enthalten, wie z.B. cholinerge Neuronen im Nucleus basalis, sind besonders anfällig für Alzheimer (Gibson et al., 1988; Ko et al., 2001).

Der Zitratzyklus wird durch acht Enzyme katalysiert, von denen der KGDHC die geringste Aktivität aufweist (Lai et al., 1977). Folglich gilt der KGDHC als einer der ratenlimitierenden Enzyme des Tricarbonsäurezyklus (TCAC). Es wurde vermutet, dass die reduzierte Aktivität dieses Enzymkomplexes eine Kaskade schädlicher Prozesse, wie z.B. metabolisches Versagen, Depolarisieren der mitochondrialen Membran, Calciumüberladung, sowie Cytochrom c Freisetzung in Gang setzt, was schließlich zum Zelltod führt (Huang et al., 2003). Dieselbe Kaskade wurde für den massiven Zelltod von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten verantwortlich gemacht (Fiskum et al., 2003).

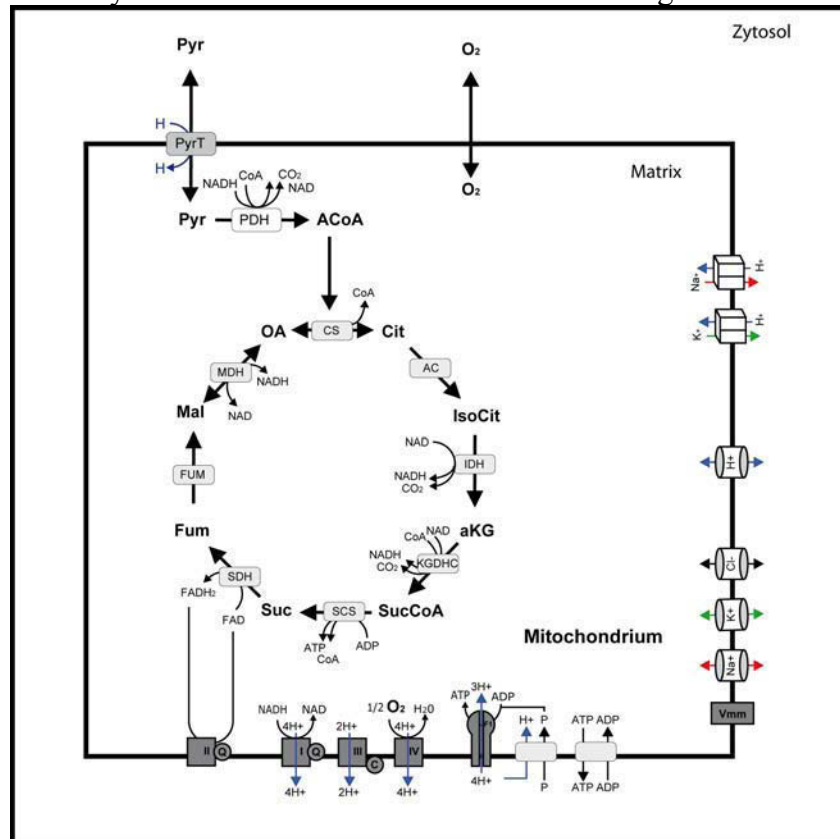
Die molekularen Mechanismen, die dem altersbedingten Verlust an KGDHC Aktivität zugrunde liegen, sind unklar. Deaktivieren des Komplexes durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wäre eine mögliche Erklärung, da gezeigt wurde, dass der KGDHC zusammen mit der Aconitase das Hauptangriffsziel von ROS im Zitratzyklus darstellt (Tretter and Adam-Vizi, 2000).

Um die Folgen einer reduzierten Aktivität der TCAC Enzyme KGDHC und Aconitase auf den mitochondrialen Energiemetabolismus und die Bildung von ROS durch die Atmungskette aufzuklären, haben wir ein detailliertes Modell entwickelt. Es umfasst den TCAC, die Atmungskette (respiratory chain - RC), den Adeninnucleotidaustausch zwischen mitochondrialer Matrix und Zytosol, die oxidative Phosphorylierung und den Ionenaustausch über die innere Mitochondrienmembran. Besonderer Wert wurde auf das Teilmodell der RC gelegt, das beschreibt den Elektrontransport als einen mehrstufigen Prozess beschreibt, in dem einige der intermediären Redoxmoleküle eine Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff erlauben, wobei Superoxidanionen (ROS) entstehen.

## 5.2 Modell

Das Reaktionsschema des kinetischen Modells ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Modell umfasst die Reaktionen des Zitratzyklus, der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung,

der mitochondrialen ATP Produktion, des Adeninnukleotidaustausches zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol und dem Austausch kleiner Ionen über die innere Mitochondrienmembran. Da mehr als 90% der ATP Produktion in neuronalen Zellen auf die oxidative Phosphorylierung entfällt, wurde auf die Glykolyse verzichtet. Die extramitochondriale Pyruvatkonzentration wurde dabei konstant gehalten.



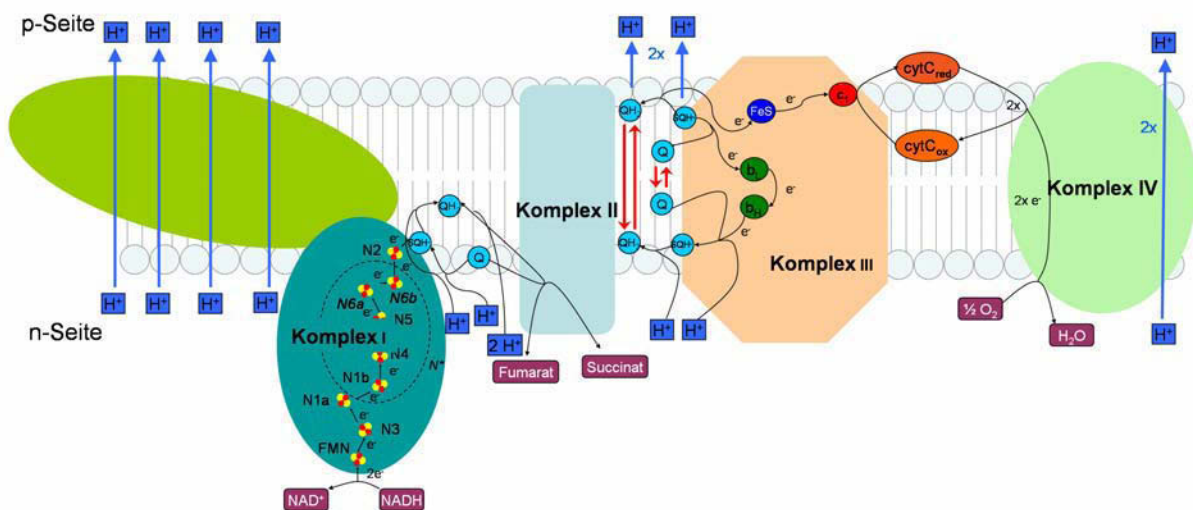
**Abbildung 5.1: Schema der im Modell berücksichtigten Prozesse.** Pyruvat (Pyr) ist das einzige Substrat des TCAC. Pyruvat wird durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA (ACoA) decarboxyliert, welches dann mit Oxalacetat (OA) durch die Zitratsynthase (CS) zu Zitrat (Cit) kondensiert wird. Zitrat wird mittels der Aconitase (AC) in Isozitrat (IsoCit) überführt, welches, durch die Isozitratdehydrogenase (IDH), zu  $\alpha$ -ketoglutarat dehydriert wird, wobei NADH aus NAD entsteht. Der  $\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenaskomplex (KGDHC) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -ketoglutarat zu Succinyl-CoA (SucCoA) unter Verbrauch von CoA-SH und Bildung von NADH. Succinyl-CoA phosphoryliert in der von der Succinyl-CoA-Synthase katalysierten Substratkettenphosphorylierung ADP zu ATP unter Bildung von Succinat. Succinate wird anschließend von der Succinatdehydrogenase (SDH, Komplex II) zu Fumarat dehydriert, wobei Wasserstoff von dem mit dem Enzym kovalent gekoppelten Flavinnukleotid FAD übernommen wird. Das gebildete FADH reduziert dann Ubiquinon zu Ubiquinol (siehe auch Abbildung 5.2). Die Fumerase (Fum) wandelt Fumarat unter Anlagerung von Wasser zu Malat (Mal) um, das anschließend durch die Malatdehydrogenase (MDH) oxidiert wird. Dabei entsteht wiederum NADH und das anfängliche Oxalacetate wird regeneriert, so dass der Zyklus von neuem beginnen kann. In Summa entstehen durch die PDH und den TCAC ein Molekül ATP aus ADP, ein Molekül Ubiquinol aus Ubiquinon und vier Moleküle NADH aus NAD, wobei ein Pyruvat zu drei Molekülen  $\text{CO}_2$  oxidiert wird. Die Oxidation von NADH und/oder Succinat durch die Atmungskette ist an das Pumpen von Protonen über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt, das den Protonengradienten und das mitochondriale Membranpotential generiert. Der Protonengradient wird genutzt, um die Pyruvataufnahme aus dem Zytosol in die Matrix mittels Pyruvattransportern anzutreiben, das Pumpen von Natrium und Kalium aus dem Matrixraum in den Intermembranraum/Zytosol zu ermöglichen, sowie die Phosphateaufnahme aus dem Zytosol in den Intermembranraum zu erlauben. Die gesamte Protonentreibende Kraft aus Protonengradient und Membranpotential dient der Herstellung von ATP durch die  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase. Das mitochondriale Membranpotential treibt auch den Austausch von ATP aus der Matrix mit ADP aus dem Intermembranraum/Zytosol mit Hilfe des Adeninnukleotidtranslokators an. Das Modell enthält außerdem den passiven, durch Elektrodifusion angetrieben, Austausch von Protonen, Natrium, Kalium und Chlorid zwischen der Matrix und dem Intermembranraum/Zytosol, sowie das mitochondriale

**Mmembranpotential.** Der zytosolische ATP-Verbrauch wird in diesem Modell durch eine einzige Bruttoreaktion (ATPase) repräsentiert.

Das kinetische Modell konzentriert sich auf die mitochondriale ATP Produktion. Da mehr als 90 % der ATP-Produktion in neuronalen Zellen auf die oxidative Phosphorylierung entfallen (Rolfe and Brown, 1997), wurde die Glykolyse nicht explizit in das Modell einbezogen und die zytosolische Pyruvatkonzentration als konstant angenommen.

Das Modell unterscheidet zwischen zytosolischem und mitochondrialem Kompartiment. Es umfasst 184 Variable, die den neuronalen Zitratzyklus, die Atmungskette, die oxidativen Phosphorylierung, die mitochondriale ATP Produktion, den Adeninnukleotidaustausch zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol sowie die elektrophysiologische Kopplung zwischen diesen Pathways beschreiben. Da zytosolische Reduktionsequivalente nicht berücksichtigt wurden ist das Aspartat-Malat-Shuttle nicht Teil des Modells. Mitochondriales Calcium ist ein starker Aktivator der PDH, IDH und des KGDHC. Die mitochondriale Calciumkonzentration variiert im physiologischen Bereich in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential (Chalmers and Nicholls, 2003; Duchon, 1992). Der Einfachheit halber haben wir die mitochondriale Calciumkonzentration als lineare Funktion des mitochondrialen Membranpotentials modelliert.

Um die mögliche Bildung von ROS mit unserem Modell beschreiben zu können, entwickelten wir ein detailliertes Teilmodell der Atmungskette. Es berücksichtigt explizit die Substrukturen von Komplex I und Komplex III, die aus verschiedenen prosthetischen Gruppen und Eisen-Clustern bestehen (siehe Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2:** Schematische Abbildung der Atmungskette. In Komplex I der Atmungskette wird NADH zu NAD oxidiert, wobei vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum/Zytosol gepumpt werden. Die Elektronen vom NADH werden erst von dem Flavinmononucleotid (FMN) aufgenommen und von diesem, sukzessive über die verschiedenen Fe-S-Cluster, auf Ubiquinon (Q), welches sich in der inneren mitochondrialen Membran befindet, übertragen, wobei als Zwischenstufe zunächst Semiubiquinon (QH) und dann Ubiquinol (QH<sub>2</sub>) entstehen. Gleichzeitig werden dabei zwei Protonen aus der Matrix aufgenommen. Die Reduktion von Ubiquinon zu Ubiquinol kann auch in Komplex II durch Übernahme jeweils eines Elektrons von dem an die Succinatdehydrogenase gebundenen FADH und dem reduzierten Cytochrom b (b<sub>H</sub>) erfolgen (das FADH-Intermediat der SDH ist hier nicht explizit gezeigt). Bei dieser Reduktion werden ebenfalls zwei Protonen aus der Matrix aufgenommen, aber keine Protonen über die mitochondriale Membran gepumpt. In Komplex III wird Ubiquinol im inneren der mitochondrialen Membran zu Ubiquinon oxidiert. Über den Mechanismus des Q-Zyklus werden zwei Protonen aus der Matrix aufgenommen und vier Protonen in den Intermembranraum/Zytosol entlassen. Die zwei Elektronen werden nacheinander über Eisen-Schwefel-

**Cluster auf Cytochrom c1 übertragen und reduzieren anschließend zwei Moleküle Cytochrom c. In Komplex IV werden zwei Moleküle reduziertes Cytochrom c oxidiert und Sauerstoff, bei gleichzeitiger Überführung von zwei Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum/Zytosol, zu Wasser reduziert. Mit NADH oder Succinat als Substrat pumpt die Atmungskette zehn bzw. sechs Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum/Zytosol, wobei ein Wassermolekül entsteht.**

Die funktionellen Gruppen von Komplex I sind das Flavinmononucleotid (FMN), acht Eisen-Schwefel-Cluster (die da N3, N1a, N1b, N4, N5, N6a, N6b und N2 heißen) und die Andockstelle für Ubiquinon. FMN nimmt zwei Elektronen von NADH auf, wobei vollständig reduziertes Flavin entsteht. Die Elektronen werden dann nacheinander auf die dahinter liegenden Eisen-Schwefel-Cluster übertragen. Nachdem das erste Elektron übertragen wurde, liegt das Flavin als Flavinradikal vor. Vom letzten Eisen-Schwefel-Cluster N2 wird das Elektron auf Ubiquinon übertragen, wobei ein gebundenes Semiubiquinon entsteht. Die gesamte Elektronenübertragung findet im in den Matrixraum hinausragenden Arm von Komplex I statt, während sich die Umwandlung von Ubiquinon zu Ubiquinol auf der n-Seite der inneren mitochondrialen Membran ereignet. Der Transfer eines Elektrons von N6b auf N2 und von N2 auf Ubiquinon ist an den Transport von einem Proton aus der Matrix in das Zytosol verbunden. Im Modell wird der Reduktionsstatus von Komplex I als ein Array von ganzen Zahlen repräsentiert, indem sowohl der Reduktionszustand des Flavinmononucleotides, aller Eisen-Schwefel-Cluster als auch der Bindungszustand vom Semiubiquinon abgebildet werden. Alle Reaktionen werden mit reversibler Massenwirkungskinetiken beschrieben. Modellsimulationen haben gezeigt, dass das Zusammenfassen der Eisen-Schwefel-Cluster N1b, N4, N5, N6a und N6b die Resultate nur unwesentlich beeinflusst, die Variablenzahl für die Atmungskette jedoch von 1536 auf 96 verringert.

Der Zustand von Komplex III wird durch einen Array repräsentiert, der die Reduktions- und Bindungszustände seiner funktionellen Gruppen - Cytochrom c1 ( $c_1$ ), der Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S), die Bindungsstelle für Semiubiquinon an der p-Seite ( $SQ_p$ ), das niedrige Häm b ( $b_L$ ), das hohe Häm b ( $b_H$ ) und die Bindungsstelle für Semiubiquinon an der n-Seite ( $SQ_n$ ) - beschreibt. Die räumliche Anordnung dieser Redoxcarrier ermöglicht die Übertragung zweier Elektronen von einem Ubiquinolmolekül auf zwei Moleküle Cytochrom c mittels des Q-Zyklus. Ubiquinol diffundiert von der n-Seite auf die p-Seite, reagiert mit oxidiertem Fe-S, welches dadurch reduziert wird, und wodurch ein gebundenes Semiubiquinon an der p-Seite entsteht. Das gebundene Semiubiquinon reduziert  $b_L$  und freies Ubiquinon diffundiert zurück zur n-Seite. Erst nachdem Ubiquinon an der p-Seite freigelassen wurde, ist der reduzierte Fe-S in der Lage, sein Elektron auf oxidiertes Cytochrom c1 zu übertragen, das es an Cytochrom c weiterreicht. Das reduzierte  $b_L$  überträgt sein Elektron auf oxidiertes  $b_H$ . Das reduzierte  $b_H$  reagiert mit Ubiquinon an der n-Seite zu oxidiertem  $b_H$  und gebundenem Semiubiquinon. Nach einer weiteren Runde überträgt reduziertes  $b_H$  sein Elektron auf gebundenes Semiubiquinon. Auf diese Art und Weise wird ein Elektron in jedem Durchlauf von Ubiquinol recycelt und je Elektron das auf Cytochrom c übertragen wird, werden zwei Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum/Zytosol transferiert. Wesentlich ist die Annahme, dass die Elektronen von Ubiquinol an der p-Seite in einem zweistufigen Prozess übertragen werden, so dass erst Fe-S reduziert wird und  $SQ_n$  entsteht und danach  $b_L$  reduziert und  $Q_n$  freigesetzt wird. Solange  $SQ_n$  gebunden ist, kann Fe-S sein Elektron nicht auf c1 übertragen. Das ergibt 48 Zustände und 88 Reaktionen für Komplex III. Alle Elektronenübergänge in Komplex I und Komplex III werden durch reversible Massenwirkungskinetiken beschrieben. Weiter Einzelheiten sind in Anhang zu Kapitel 5 zu finden.

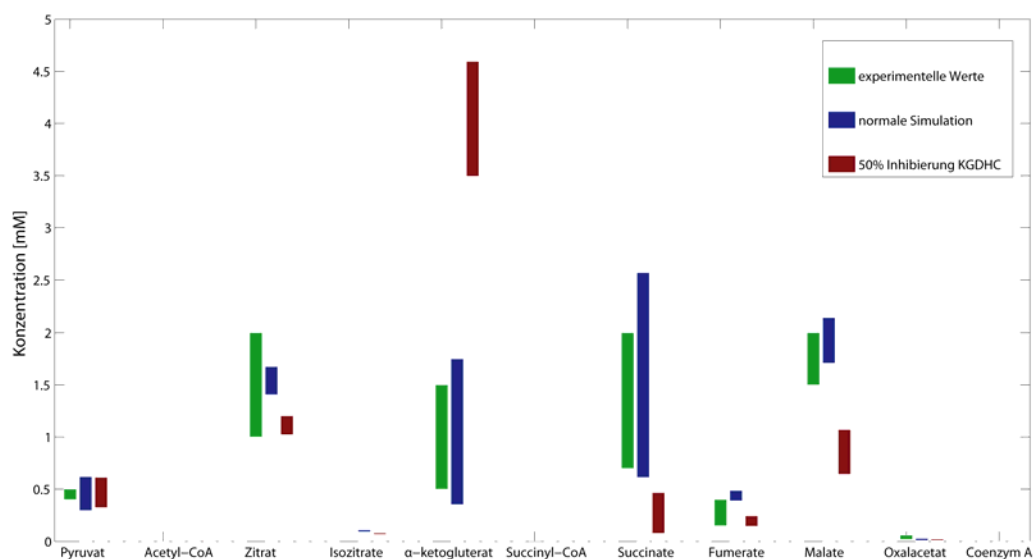
Unser Teilmodell der Atmungskette erweitert bestehende Modelle für Komplex III (Demin et al., 2001) indem Cytochrom c1 und  $SQ_n$  in den Zustandsraum miteinbezogen werden.

Die detaillierten kinetischen Gleichungen für die Reaktionen und Transporter (siehe Anhang Kapitel 5) sind spezifisch für Gehirn neuronales Gewebe und basieren auf ausführlicher Literaturrecherche.  $V_{\max}$ -Werte wurden angepasst, um simulierte und experimentelle Metabolitkonzentrationen in Übereinstimmung zu bringen. Das Modell wurde in MATLAB (the Math-Works, version R2011b) implementiert.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Analyse des normalen mitochondrialen Energiemetabolismus

Als erstes definierten wir einen normalen Referenzzustand, in dem der zytosolische ATP-Verbrauch, der im stationären Zustand gleich der mitochondrialen ATP-Produktion ist, 30 % des maximalen ATP-Verbrauches ausmacht. In diesem Referenzzustand werden, in Übereinstimmung mit experimentellen Daten (Krishnamoorthy and Hinkle, 1984; Nicolli et al., 1991; Rolfe et al., 1994), 24 % des Protonengradienten für den passiven Protonenrückstrom über die innere Mitochondrienmembran (=Protonenleck), 16 % für das Pumpen von Kalium und 60 % für die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase und die Phosphataufnahme aufgewendet. Als nächstes kalibrierten wir unser Modell ( $V_{\max}$ -Werte) derart, dass gemessene intramitochondriale Metabolitkonzentrationen (siehe Abbildung 5.3, grüne Balken) mit dem Modell reproduziert wurden. Danach wurde der ATP-Verbrauch bis zu seinem Maximalwert erhöht und die Spanne der resultierenden stationären Metabolitkonzentrationen berechnet (siehe Abbildung 5.3, blaue Balken).

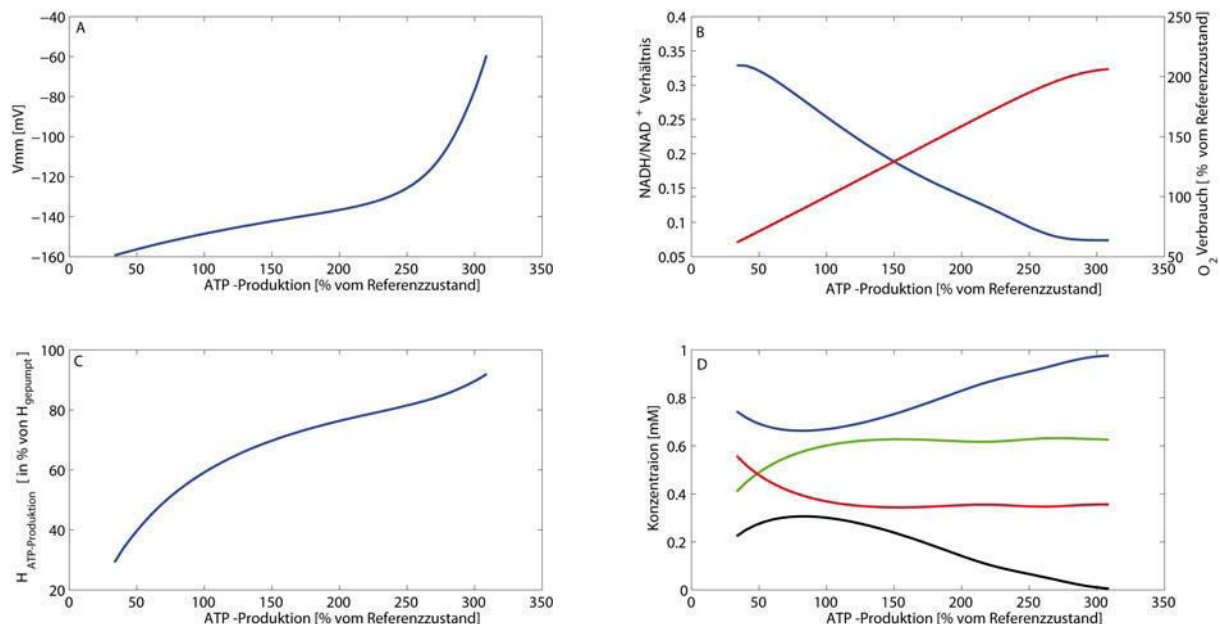


**Abbildung 5.3: Vergleich der simulierten mit den experimentell bestimmten Konzentrationen von TCAC Intermediaten.** Die grünen Balken zeigen die Konzentrationsbereich der experimentellen Werte (Benzi et al., 1979; Brown and Brand, 1988; Folberggr.J et al., 1974; Gibala et al., 1998; Gorell et al., 1977; Hansford and Johnson, 1975; Simpson and Angielsk.S, 1973; Smith et al., 1974) . Die blauen Balken (Normalzustand) und die roten Balken (50 % Inhibierung der KGDHC) zeigen die Verschiebungen in den Metabolitkonzentrationen bei Variieren der energetischen Belastung zwischen 33 % und 100 % der energetischen Maximalbelastung an.

Um die Verlässlichkeit unseres Modells zu testen, haben wir die belastungsabhängigen Veränderungen weiterer Modellvariablen mit experimentellen Befunden aus verschiedenen Gewebearten verglichen (Siehe Abbildung 5.4). Das Membranpotential ist für eine große Spanne des ATP-Verbrauchs bemerkenswert konstant zwischen -150 mV und -120 mV in



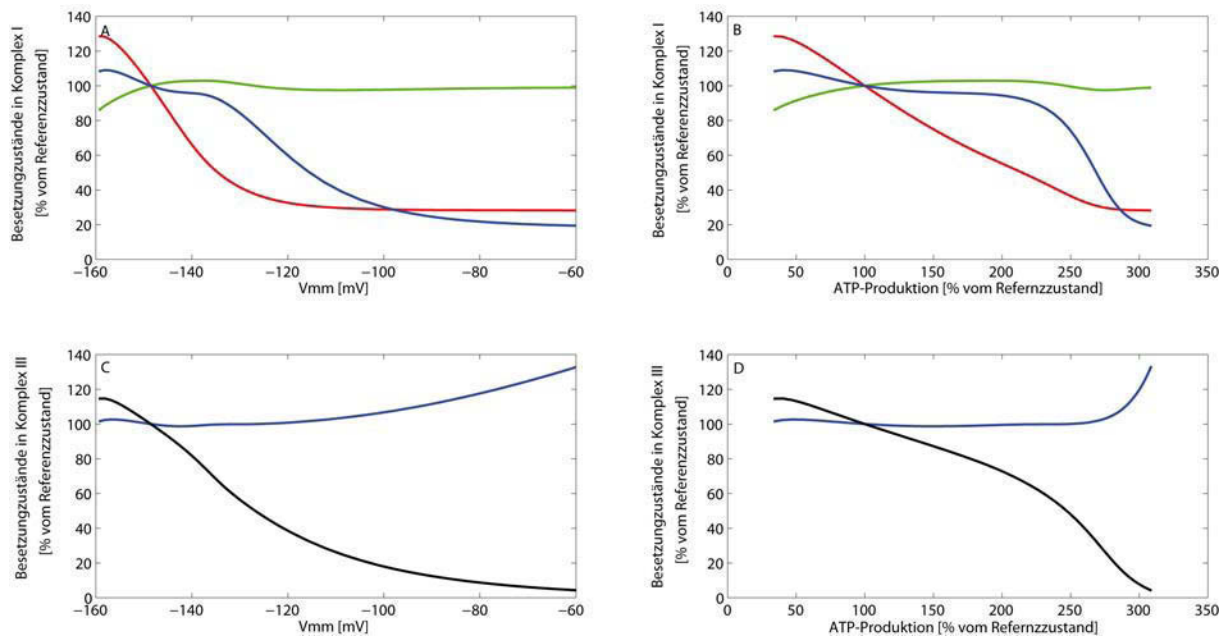
Übereinstimmung mit experimentellen (LaNoue et al., 1995). Oberhalb des 2.5-fachen ATP-Verbrauchs im Vergleich zum Referenzzustand wird eine weitere kleine Steigerung des ATP-Verbrauchs jedoch von einer starken Depolarization des Membranpotentials begleitet, was auf metabolisches Versagen schließen lässt. Das mitochondriale Redoxpotential (ausgedrückt durch das NADH/NAD Verhältnis) weist für einen ATP-Verbrauch bis um 2.5-fachen des Referenzwertes ein quasi-linearen Abfall von 0.3 auf 0.1 auf. Gleichzeitig verdoppelt sich der Sauerstoffverbrauch. Die Tatsache, dass sich der Sauerstoffverbrauch nur verdoppelt, während sich der ATP-Verbrauch verdreifacht, wird durch einen erhöhten Effizienzgrad der ATP-Produktion erreicht, d.h. der relative Anteil der für die ATP-Produktion aufgewendeten Protonen an den durch die Atmungskette gepumpten Protonen erhöht sich von 60 % auf über 90 % (siehe Abbildung 4c). Das gesamte Ubiquinol zu Ubiquinon Verhältnis (an n-Seite und p-Seite) variierte zwischen 1.5 und 0.5 in Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen (Brown and Brand, 1988). Auf der mitochondrialen p-Seite fällt dieses Verhältnis von 1 auf Null, was darauf hinweist, dass bei hohem ATP-Verbrauch die Diffusion von Ubiquinol den ratenlimitierenden Schritt darstellt. (Chazotte and Hackenbrock, 1989).



**Abbildung 5.4: Systemcharakteristiken bei veränderter energetischer Belastung.** (a) mitochondriales Membranpotential; (b) blau zeigt das mitochondriale NADH zu NAD Verhältnis, rot den Sauerstoffverbrauch; (c) Anteil der ATP-Synthese an den durch die RC gepumpten Protonen; (d) blau: Ubiquinonkonzentration an der p-Seite, grün: Ubiquinolkonzentration an der n-Seite, rot: Ubiquinonkonzentration an der n-Seite, schwarz: Ubiquinolkonzentration an der p-Seite. Die ATP-Produktion und der Sauerstoffverbrauch sind auf den Referenzzustand normiert.

Da in der Literatur verschiedene Reaktionszentren für die mitochondriale ROS Erzeugung in der Atmungskette vorgeschlagen wurden, protokollierten wir die Besetzungszustände der vermuteten Reaktionszentren bei variablem ATP-Verbrauch (siehe Abbildung 5). Aufgrund unserer Modellsimulationen folgern wir, dass das vollständig reduzierte Flavin, das Semiubiquinon gebunden an der n-Seite von Komplex I, und das Semiubiquinon gebunden an der p-Seite von Komplex III, mit dem gemessenen Zusammenhang zwischen ROS-Erzeugung und Membranpotential übereinstimmen (Miwa and Brand, 2003; Starkov and Fiskum, 2003), während das Flavinradikal und das an der p-Seite gebundene Semiubiquinon als hauptsächliche ROS Erzeuger ausgeschlossen werden können.

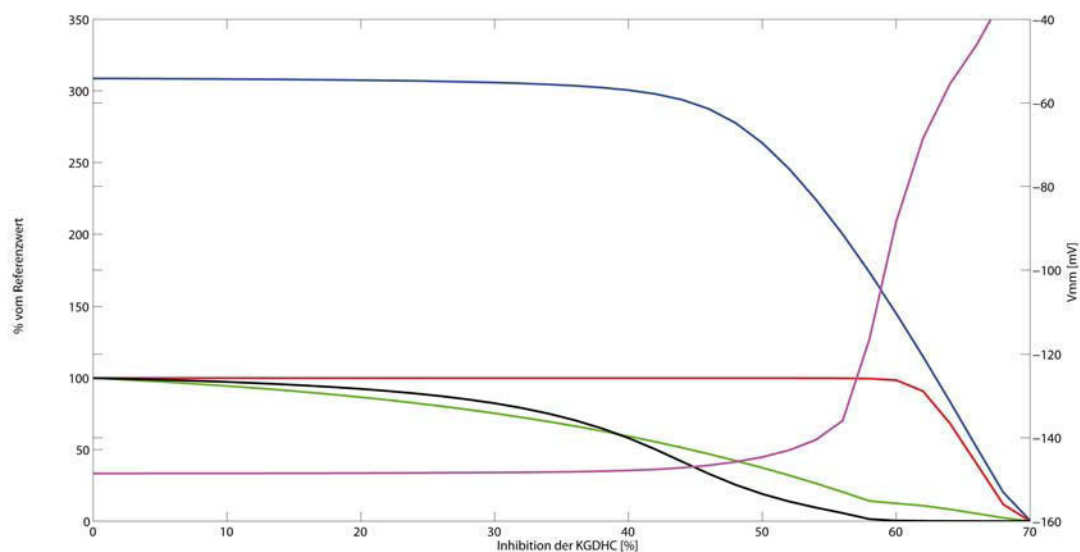




**Abbildung 5.5: Mögliche ROS-erzeugende Reaktionszentren der RC.** Die Besetzungszustände der ROS erzeugenden Reaktionszentren von Komplex I ((a) und (b)) und Komplex III ((c) und (d)) wurden gegen das Membranpotential ((a) und (c)) und die ATP-Produktionsrate ((b) und (d)) aufgetragen. Rot: vollreduzierte Flavin, grün: Flavinradikal, blau: Semiquinon an der n-Seite an den jeweiligen Komplex gebunden, Schwarz: Semiquinon an der p-Seite von Komplex III gebunden. Die ATP-Produktion und der Besetzungszustand der ROS erzeugenden Reaktionszentren sind auf den Referenzzustand normiert.

### 5.3.2 Analyse des mitochondrialen Energiemetabolismus bei reduzierter KGDHC Aktivität

Als nächstes untersuchten wir die Auswirkungen von KGDHC und Aconitase Inhibition auf den Energiemetabolismus. Die Simulation in Abbildung 5.6 wurden bei fortschreitendem Grad der Inhibition der KGDHC von 0 % auf 70 % durchgeführt.

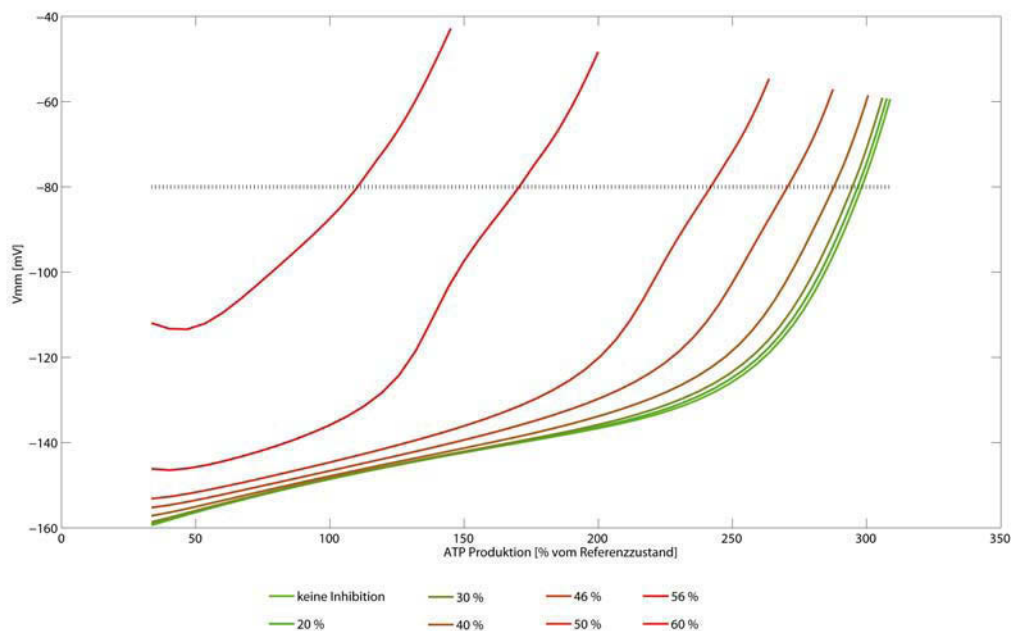


**Abbildung 5.6: Systemverhalten bei KGDHC Inhibition.** ATP-Produktionsrate (rot), NADH Konzentration (grün), mitochondriales Membranpotential (magenta, rechte Skala) und Konzentration von reduziertem Cytochrom c (schwarz) bei normalem ATP-Verbrauch aufgetragen gegen den

**Inhibierungsgrad der KGDHC.** Die maximal mögliche ATP-Produktionsrate ist in blau dargestellt. Bis auf das Membranpotential sind alle Werte normalisiert auf den Referenzzustand angegeben.

Die maximale ATP-Produktionskapazität nahm bis zu einer Inhibition von ca. 50 % sehr langsam ab. Weitere Inhibition führte zu einem annähernd linearen Abfall in der maximalen ATP-Produktionsrate und letztendlich zu einem linearen Abfall der ATP-Produktionsrate beim Referenzverbrauch. Demnach kann der ATP Bedarf im Referenzzustand bis zu einer Inhibition von ungefähr 60 % befriedigt werden. Bei einer KGDHC Inhibition von 70 % ist das System bereits zusammengebrochen, wie man am Membranpotential sehen kann. Fortlaufende Verarmung an NADH (grüne Kurve) führt auf nicht linearer Weise zu einer Verarmung an reduziertem Cytochrom c (schwarze Kurve), das letztendlich für den metabolischen Zusammenbruch bei hoher KGDHC Inhibition verantwortlich ist. Solange Cytochrom c nicht vollständig oxidiert ist, kann das Membranpotential nahe am Referenzwert gehalten werden. Man sollte bei der Interpretation dieser Ergebnisse in Bereichen, wo die Membran stark depolarisiert ist ( $V_{mm} > -80$  mV), sehr vorsichtig sein, da dann sehr wahrscheinlich Mechanismen, die nicht Teil des Modells sind (wie z.B. der Beginn des apoptotischen Pathways/ Öffnen der mitochondrialen Transitions-pore (Crompton, 1999)) das Verhalten dominieren. hallo

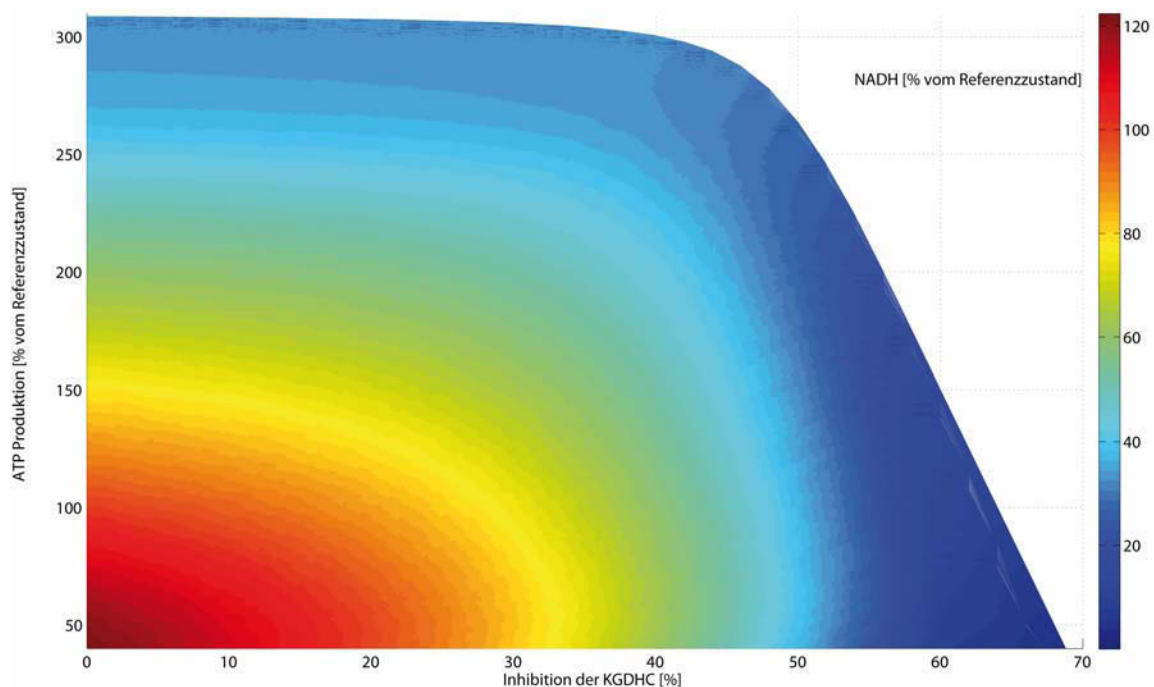
Inhibition der KGDHC führt auch zu starken Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen der TCAC Intermediate. Abbildung 5.3 zeigt die Konzentrationsbereiche der TCAC Intermediate, bei variabler energetischer Belastung, bei 50 % Inhibition der KGDHC (rote Balken). Durch einen dramatischen Anstieg der  $\alpha$ -ketoglutarat Konzentration wird der Verlust der Enzymaktivität durch eine höhere Sättigung des Enzyms mit seinem Substrat teilweise ausgeglichen. Andere Metabolite des TCAC weisen dafür eine geringere Konzentration im Vergleich mit dem Referenzzustand auf.



**Abbildung 5.7:** Verhalten des mitochondrialen Membranpotentials bei verschiedenen Graden von KGDHC Inhibition. Das mitochondriale Membranpotential ist gegen die ATP-Verbrauchsrate aufgetragen. Die gestrichelte Linie: Membranpotential -80 mV

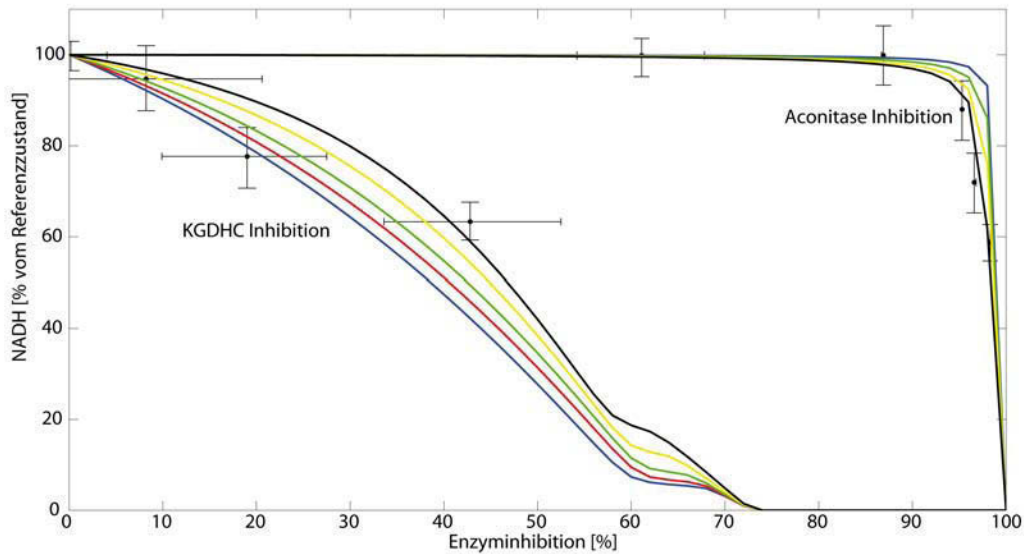
Die Abhängigkeit des mitochondrialen Membranpotentials vom ATP-Verbrauch bei verschiedenen Inhibitionsgraden des KGDHC ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Bei moderater Inhibition von < 30 %, beträgt die Depolarisation des Membranpotentials bis zu 2.5-fach erhöhtem Energieverbrauch lediglich 20 mV, d.h. ein signifikanter Anstieg des

Membranpotentials kommt erst bei sehr hoher energetischer Belastung vor. Bei KGDHC Inhibition von etwa 60 %, ist das Membranpotential bereits bei normalem ATP-Verbrauch erhöht, eine starke Depolarisation setzt bei viel geringerem ATP-Verbrauch ein. Unter der Annahme, dass pathologische Zustände des Mitochondriums bei Werten des Membranpotentials über -80 mV auftreten (gestrichelte Linie in Abbildung 5.7), führt eine stärkere Inhibition des KGDHC zu dramatischer Verminderung des tolerierbaren maximalen ATP-Verbrauchs und einer fortschreitenden Depolarisation der Membran bei normaler Belastung.



**Abbildung 5.8: Verhalten des NADH Spiegels abhängig vom ATP-Bedarf und der KGDHC Inhibition. Der NADH Spiegel ist als Farbwert dargestellt (rechte Skala). NADH Spiegel und ATP-Produktion sind auf den Referenzzustand normalisiert.**

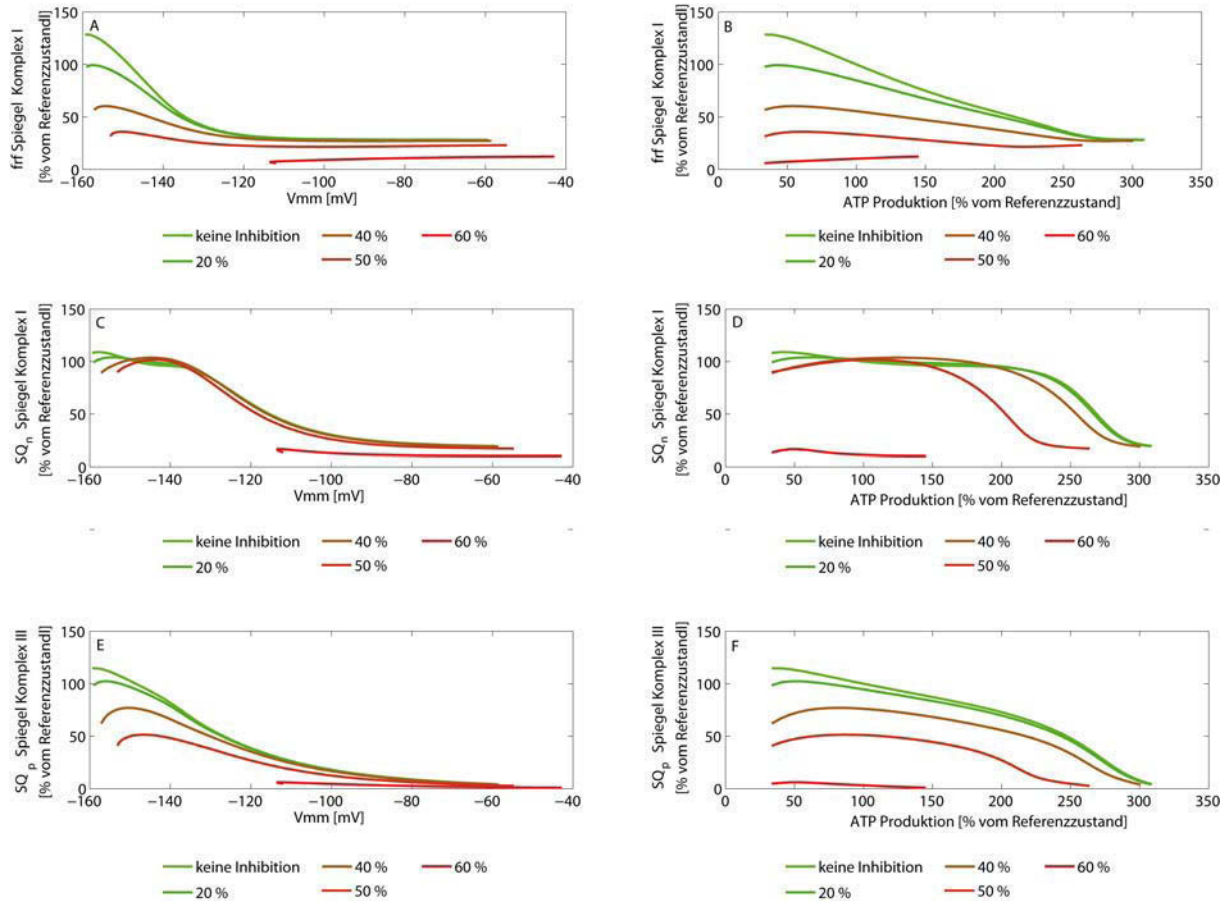
Der Redoxzustand der RC spiegelt die verbleibende Kapazität des Mitochondriums Energie bereitzustellen wider. Abbildung 5.8 zeigt den gemeinsamen Einfluss der KGDHC Inhibition und der energetischen Belastung auf den mitochondrialen NADH Spiegel. Ganz allgemein ist ein erhöhter Energiebedarf äquivalent zu einer erhöhten KGDHC Inhibition. Z.B hat eine 40 %-ige Inhibition die gleichen Auswirkungen auf den NADH Spiegel wie ein 1.5-fach erhöhter Energiebedarf. Die Auswirkungen von KGDHC und Aconitase Inhibition auf den mitochondrialen NADH Gehalt wurde experimentell untersucht (Tretter and Adam-Vizi, 2000). Abbildung 5.9 zeigt, dass sich unsere Simulationsergebnisse in guter Übereinstimmung mit diesen experimentellen Daten befinden. Die Inhibition des KGDHC hat einen viel stärkeren Einfluss auf den NADH Gehalt als die Inhibition der Aconitase. Während eine 40 %-ige Inhibition des KGDHC den NADH Spiegel auf etwa die Hälfte absenkt, muss die Aconitase zu 95 % gehemmt werden um den gleichen Effekt zu erzielen.



**Abbildung 5.9:** Vergleich zwischen experimentell bestimmten NADH Konzentration und Simulation. Die experimentell bestimmte NADH Konzentration ist mit schwarzen Punkten versehen mit Fehlerbalken bei verschiedenen Inhibitionsgraden von KGDHC und Aconitase dargestellt (Daten aus (Tretter and Adam-Vizi, 2000) ). Die verschiedenen Farben stehen für verschiedenen Energiebedarf von niedrig (blau) zu hoch (schwarz). Die grüne Kurve zeigt den Energiebedarf für den Referenzzustand. Der NADH Spiegel ist auf den NADH Spiegel ohne Enzyminhibition bezüglich des Energiebedarfs normiert.

### 5.3.3 ROS-Erzeugung durch die RC bei KGDHC Inhibierung

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss der KGDHC Inhibierung auf die ROS Produktion der RC. Dafür haben wir den Besetzungszustand der ROS-erzeugenden Reaktionszentren der RC bei KGDHC Inhibierung berechnet. Da wir aufgrund unserer Simulationen für den Referenzzustand das Flavinradikal in Komplex I und das gebundene Semiubiquinon an der n-Seite von Komplex III als hauptsächliche ROS Erzeuger ausgeschlossen haben, sind nur das vollständig reduzierte Flavin und das gebundene Semiubiquinon auf der n-Seite in Komplex I, sowie das gebundene Semiubiquinon an der p-Seite von Komplex III dargestellt. Mit zunehmender KGDHC Inhibierung ging eine erstaunliche Verminderung des Besetzungszustandes des vollständig reduzierten Flavins in Komplex I, sowie des  $SQ_p$  in Komplex III bei allen energetischen Belastungen (Abbildung 10) einher, während die Veränderungen in  $SQ_n$  von Komplex I vernachlässigbar waren. Oberhalb einer 2.5-fachen Erhöhung der energetischen Belastung, die mit einer Depolarisierung der Membran über -100 mV einherging, ist die RC fast vollständig oxidiert, so dass eine weiter KGDHC Inhibierung nur marginale Auswirkungen auf die Besetzungszustände der ROS erzeugenden Reaktionszentren hat.



**Abbildung 5.10: Besetzung der ROS-erzeugenden Reaktionszentren der RC bei KGDHC Inhibition.** Besetzungszustand des vollständig reduzierten Flavins (frf) ((a) und (b)), des Semiubiquinons von Komplex I gebundene an der n-Seite ((c) und (d)) und des gebundenen Semiubiquinons von Komplex III gebundene an der p-Seite ((e) und (f)) bei verschiedenen Inhibierungsgraden des KGDHC. Die Besetzungszustände sind gegen das Membranpotential ((a), (c) und (e)) sowie gegen die ATP-Produktionsrate ((b), (d) und (f)) aufgetragen. Alle Werte bis auf das Membranpotential sind auf den Referenzzustand normiert.

## 5.4 Diskussion

Eine verminderte KGDHC Aktivität von neuronalen Zellen im Gehirn wird mit einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Um den Einfluss eines verminderten KGDHC auf den mitochondrialen Energiemetabolismus zu untersuchen, haben wir ein detailliertes mathematisches Modell der wesentlichen mitochondrialen ATP liefernden Prozesse entwickelt.

In Übereinstimmung mit experimentellen Befunden, sagt unser Modell einen stetigen Rückgang des mitochondrialen NADH Spiegels bei fortschreitender KGDHC Hemmung voraus, während eine Hemmung der Aconitase bis zu 95 % kaum Auswirkungen hatte. Dieses Ergebnis bestätigt die Auffassung, dass der KGDHC ratenlimitierend für den TCAC ist. Eine Abnahme der NADH-Fluoreszenz bei Inhibition des KGDHC wurde als Hinweis für eine verminderte ATP-Produktionskapazität aufgefasst (Tretter and Adam-Vizi, 2000). Der Vorteil unseres Modells besteht in der Möglichkeit, Vorhersagen über den Zusammenhang von NADH Verarmung und ATP-Produktion zu machen. Unsere Simulationen legen nahe, dass eine Verarmung an NADH sich nicht in linearer Weise in eine verminderte ATP-Produktionsrate übersetzt. Das liegt daran, dass bei Hemmung des KGDHC kompensatorische



Verschiebungen in den Metabolitkonzentrationen der TCAC Intermediate den Fluss durch den TCAC über einen weiten Inhibitionsbereich annähernd konstant halten. Das gilt sowohl bei normalem als auch bei moderat erhöhtem Energiebedarf. Ein erhöhter  $\alpha$ -ketoglutarat Spiegel aktiviert den verbliebenen intakten KGDHC und hält somit den Fluss durch den Enzymkomplex aufrecht. Das führt zu einer Erhöhung des  $\alpha$ -ketoglutarat Spiegels (Abbildung 5.3), einem Marker für KGDHC Schädigung, da der erhöhte  $\alpha$ -ketoglutarat Spiegel auch im Blut/Urin nachweisbar ist. Das kann auch zu Glutamatvergiftung führen, da sich  $\alpha$ -ketoglutarat über eine Transaminasereaktion im Gleichgewicht mit Glutamat befindet, einem weiteren pathologischen Symptom, das in Verbindung mit KGDHC Hemmung auftritt (Santos et al., 2006).

Unsere Simulationen machen auch klar, dass eine Beeinträchtigung des Energiemetabolismus vom funktionellen Zustand des Neurons abhängt. Bei starker Inhibition und/oder hoher energetischer Belastung wird die Energieproduktion stark beeinträchtigt und reicht möglicherweise nicht für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen aus. Das geht mit einer starken Membrandepolarisation einher.

Es gibt eine auffällige Korrelation zwischen einer verminderten KGDHC Aktivität und dem Verlust an glutamatergen Neuronen, wie er z.B. bei Alzheimer oder Parkinson auftritt (Ko et al., 2001). Programmierter Zelltod mittels Apoptose erfordert das gleichzeitige Auftreten dreier Ereignisse: Depolarisation der mitochondrialen Zellmembran, niedrige intrazelluläre ATP-Konzentration und mitochondriale Calciumüberladung. Die ersten beiden Bedingungen sind erfüllt, sobald Neuronen mit reduzierter KGDHC Aktivität mit einem hohen ATP-Bedarf konfrontiert werden, den sie normalerweise bewältigen könnten. Sobald die zytosolische ATP-Konzentration zu niedrig wird, kann Calcium nicht mehr in ausreichendem Maße aus der Zelle in den Extrazellulärraum gepumpt werden und die sich daraus ergebende erhöhte Calciumkonzentration führt letztendlich zu einer Überladung des Mitochondriums mit Calcium. Folglich kann eine stark reduzierte KGDHC Aktivität direkt zu Apoptose führen.

Eine Besonderheit von neurodegenerativen Erkrankungen liegt in ihrer starken Abhängigkeit vom Alter. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von mitochondrialen Schädigungen durch ROS sowohl einer der bestimmenden Faktoren von Alterserscheinungen und abnehmender Leistungsfähigkeit im Gehirn, als auch einer der Schlüssel in der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen ist (Boveris and Navarro, 2008). Einer der schädlichen Einflüsse von ROS besteht in der Inaktivierung von TCAC Enzymen. Die TCAC Enzyme, die besonders empfänglich für oxidativen Stress sind, sind der KGDHC und die Aconitase (Sadek et al., 2002; Tretter and Adam-Vizi, 2000). Die Aconitase weist aufgrund ihres Eisen-Schwefel-Komplexes die höchste Empfindlichkeit gegenüber ROS auf, jedoch spielt ihre Inhibition bis zu 90 % keine Rolle (Abbildung 5.9 und (Tretter and Adam-Vizi, 2000)). Der KGDHC ist fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden (Maas and Bisswanger, 1990) und möglicherweise Teil eines Zitratzyklussuperkomplexes (Lyubarev and Kurganov, 1989). Er bindet sich an Komplex I der RC (Sumegi and Srere, 1984), was ihn aufgrund der räumlichen Nähe zu den ROS erzeugenden Reaktionszentren zu einem exponierten Ziel von ROS macht. Folglich sind ROS ein möglicher Grund für die KGDHC Inhibition.

Es gibt keinen allgemeinen Konsens über die relative Wichtigkeit der einzelnen ROS erzeugenden Reaktionszentren. Die Abhängigkeit der ROS-Erzeugung vom Membranpotential wurde jedoch gemessen (Miwa and Brand, 2003; Starkov and Fiskum, 2003). Indem man das gemessene Verhalten mit den Besetzungszuständen der möglichen ROS erzeugenden Reaktionszentren vergleicht, kann unsere Modellierung dazu beitragen, möglich ROS-Erzeuger zu identifizieren oder andere auszuschließen (Abbildung 5). Unsere Berechnungen zeigen, dass in Abhängigkeit vom Membranpotential der Besetzungszustand des vollständig reduzierten Flavins, des  $SQ_n$  in Komplex I und des  $SQ_p$  in Komplex III, aber nicht des Flavinradikals in Komplex I und des  $SQ_n$  in Komplex III, mit den gemessenen Abhängigkeiten übereinstimmen. Bezüglich Komplex I befinden sich unsere Ergebnisse in

Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten in (Kussmaul and Hirst, 2006), die das Flavinradikal als ROS-Erzeuger ausschließen, jedoch zeigen, dass das vollständig reduzierte Flavin der ROS-Erzeuger in Komplex I ist. Bezüglich Komplex III stimmen unsere Ergebnisse mit anderen Befunden wie z.B. (Malinska et al., 2010) überein.

Da der KGDHC besonders empfindlich gegenüber ROS ist, haben wir untersucht, welchen Einfluss eine verminderte KGDHC Aktivität auf die Besetzungszustände der relevanten ROS erzeugenden Reaktionszentren hat (Abbildung 5.10). Wir fanden, dass es einen signifikanten Abfall im Besetzungszustand des vollständig reduzierten Flavins in Komplex I und von SQ<sub>p</sub> in Komplex III für jeden ATP-Bedarf gibt. KGDHC Inhibierung reduziert also durch Verminderung des Redoxzustandes des Mitochondriums die ROS-Erzeugung in der RC. Da der KGDHC auch selbst ROS produziert, und die ROS-Erzeugung dieses Enzymkomplexes mit sinkendem mitochondrialen Redoxzustand abnimmt (Tretter and Adam-Vizi, 2004), wird die endogene ROS-Erzeugung durch den KGDHC bei KGDHC Inhibierung ebenfalls reduziert.

Es muss beachtet werden, dass unser Modell die Schädigung von RC Komplexen durch ROS, wie sie in neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wurde (z.B. in (Keeney et al., 2006)), nicht berücksichtigt. Eine Verminderung der Aktivität von Komplex I führt zu einer erhöhten ROS-Erzeugung (Tretter et al., 2004). Daher können strukturelle und funktionelle Schäden in der RC den inhibitorischen Effekt der KGDHC Hemmung auf die ROS-Erzeugung überlagern.

Hier haben wir uns auf den Einfluss der KGDHC Inhibierung auf den Energiemetabolismus konzentriert. Wir haben gezeigt, dass für einen vorgegebenen Grad der Inhibierung die Auswirkungen entscheidend vom funktionalen Zustand der Zelle abhängen. Bezüglich der ROS-Erzeugung vermindert eine Hemmung des KGDHC die ROS-Erzeugung durch die RC. Nichts desto trotz gibt die detaillierte Beschreibung der RC in unserem Modell weitere Argumente für die relative Wichtigkeit der ROS erzeugenden Reaktionszentren, die in der Literatur beschrieben werden.

Insgesamt trägt unser Modell dazu bei, die kausalen Zusammenhänge der molekularen Ereignisse zu erhellen, die eine reduzierte KGDHC Aktivität mit dem energetischen Zusammenbruch einer neuronalen Zelle während der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen verbindet.

# Zusammenfassung

## Kapitel 1:

Kapitel 1 beschäftigt sich mit dem Einfluss von Chlorid auf die Genauigkeit von Aktionspotentialen und die zelluläre Volumenregulation. Unsere Simulationen zeigen, dass zwei komplementäre Phänotypen von Zellen hinsichtlich ihrer Erregbarkeit und Volumenstabilität existieren: (i) Bei hoher Chloridpermeabilität ist die Reizschwelle hoch und die zelluläre Response gegenüber wiederholter Erregung markovsch; lange Erregungszeiten können zu Nachentladungen aufgrund von ausströmenden Chlorid führen und die erregungsinduzierten Volumenänderungen sind groß. (ii) Bei niedrigen Chloridpermeabilität ist die Reizschwelle niedrig und wiederholte Erregung führt zu sukzessiven Veränderungen in der Amplitude, Frequenz und Dauer der resultierenden spike trains. Die erregungsinduzierten Volumenänderungen sind klein. Daher vermuten wir, dass die Veränderung der Chloridpermeabilität ein Mechanismus neuronaler Zellen für die Adaptation ihrer Empfindlichkeit gegenüber externen Reizen, während z.B. des Lernens oder Gedächtnisprozessen, sein kann.

## Kapitel 2:

Ausgehend von der Frage, warum neuronale Zellen einen enormen Energieaufwand zur Kompensation von passiven Leckströmen betreiben, zeigen wir ganz allgemein, dass Leckströme das Membranpotential gegen zufälligen Schwankungen von Ionenströmen stabilisieren, die mit dem sekundär-aktiven Membrantransport von Stoffen gekoppelt sind (= metabolische Ionenströme). Wir zeigen, dass es durch die abgestimmte Verminderung der Permeabilität von Leckkanälen und der Permeabilität spannungs- und ligandengesteuerter Ionenkanäle theoretisch möglich wäre, ein energetisch effizienteres Neuron zu entwerfen und dadurch den Energiebedarf des Gehirns deutlich (um etwa 50%) zu senken. Die Reduktion der Membranpermeabilitäten destabilisiert jedoch die Membranspannung gegen zufällige Variation in den metabolischen Ionenströmen und machen ein gesichertes Verarbeiten und Weiterleiten von Informationen in Form von Aktionspotentialen unmöglich. Daraus schließen wir, dass die Permeabilität der Leckkanäle, wie sie typischerweise in Neuronen und anderen erregbaren Zellen beobachtet werden, die untere Grenze darstellt, die notwendig ist, um unkontrolliertes Auslösen oder Unterdrücken von Aktionspotentialen zu verhindern.

## Kapitel 3:

Mit Hilfe eines Reaktions-Diffusions-Modells haben wir aus den Tiefenprofilen des Sauerstoffpartialdruckes in Hirnschnitten, die in verschiedenen Aktivitätszuständen des Gewebes experimentell bestimmt wurden, abgeschätzt, dass die durch Erregung bedingte Aktivität der Atmungskette maximal um einen Faktor von etwa fünf gesteigert werden kann. Durch Extrapolation der Modellsimulationen lässt sich der Abstand von der Hirn-Kapillare, der unter physiologischen Bedingungen die Versorgung mit Sauerstoff bei hoher Aktivität ermöglicht, auf 30-40  $\mu\text{m}$  abzuschätzen. Bei bekanntem interkapillaren Abstand von 40-70  $\mu\text{m}$  in Menschen und Nagetieren ergibt sich daraus, dass bei kapillarem Sauerstoffpartialdruck von weniger als 40 mmHg und Abständen von mehr als  $\sim 35 \mu\text{m}$  eine hämodynamische Response (= gesteigerte Durchblutung) zur Aufrechterhaltung hoher Aktivitätszustände notwendig wird. Aus unseren Untersuchungen schließen wir, dass das vaskuläre System nur so weit angelegt ist, als es zur Versorgung bei hoher energetischer Belastung erforderlich ist.



#### Kapitel 4:

Wir haben ein Modell des neuronalen Energiestoffwechsels entwickelt um zu untersuchen, wie die Energieversorgung neuronaler Zellen abhängig vom Aktivitätszustand und äußeren Belastungen gewährleistet werden kann. Unter Berücksichtigung verschiedenster metabolischer Zustandsgrößen zeigten wir, wie die Charakteristiken von NAD(P)H-Fluoreszenzkurven, die beim Übergang zwischen verschiedenen Aktivitätszuständen beobachtet werden, auf die zelluläre glykolytische und respiratorische Aktivität zurückzuführen sind. Außerdem zeigen wir, wie die Fähigkeit neuronaler Zellen, Lactat alternativ zur Glukose als energielieferndes Substrat zu benutzen, von ihrer glykolytischen und oxidativen Kapazität abhängt. Diese kann sowohl innerhalb einer einzelnen Zelle, als auch zwischen verschiedenen Regionen im Hirn stark variieren.

#### Kapitel 5:

Ausgehend von der Beobachtung, dass bei vielen altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, ein Rückgang der Aktivität des Enzymkomplexes  $\alpha$ -ketogluteratedehydrogenase (KGDHC) zusammen mit starken Funktionalitätsstörungen und massivem Zellsterben auftritt, haben wir den Einfluss einer gestörten KGDHC Aktivität auf den neuronalen Energiestoffwechsel untersucht. Unser Modell zeigt, wie eine reduzierte KGDHC Aktivität abhängig vom Energiebedarf der Zelle die neuronale Leistungsfähigkeit kompromittiert und, durch Energieverarmung und Membrandepolarisation, das Auslösen von Apoptose begünstigt. Außerdem waren wir in der Lage, die Reaktionszentren der Atmungskette zu identifizieren, die reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Demnach sollte eine Reduktion der KGDHC Aktivität nicht Auslöser einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sein.

## Anhang:

### Anhang Kapitel 1:

#### Parameter und Konstanten

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Beschreibung
T	293	K	(4)	Temperatur
R	8.3	$\frac{J}{mol \cdot K}$	(4)	Universelle Gaskonstante
F	96490	$\frac{C}{mol}$	(4),(9),(10)	Faradaykonstante

Tabelle 1: Konstanten

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Beschreibung
$r$	$25 \cdot 10^{-6}$	$m$	-	Zellradius
$A$	$4 \cdot \pi \cdot r^2$	$m^2$	(11)	Zelloberfläche
$\Omega_c$	$\frac{4}{3} \pi \cdot r^3$	$m^3$	(14),(17)	Zellvolumen
$\Omega_{out}$	-	$m^3$	(2)	Extrazelluläres Volumen

Tabelle 2: Geometrie

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$[Cl]_{bulk}$	8	$mM$	(1),(4),(15)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Chlorid Konz.
$[K]_{bulk}$	140	$mM$	(1),(4),(9),(15)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Kalium Konz.
$[Na]_{bulk}$	10	$mM$	(1),(4),(10),(15)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Natrium Konz.
$[Cl]_{out}$	150	$mM$	(2),(4),(16)	(Armstrong, 2003)	externe Chloride Konz.
$[K]_{out}$	4	$mM$	(2),(4),(16)	(Armstrong, 2003)	externe Kalium Konz.
$[Na]_{out}$	145	$mM$	(2),(4),(16)	(Armstrong, 2003)	externe Natrium Konz.
$[B]$	141	$mM$	(15)	(Armstrong, 2003)	impermeable Biomasse

Tabelle 3: Ionenkonzentrationen

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$c_m$	$10^{-6}$	$\frac{F}{m^2}$	(11)	(Hodgkin and Huxley, 1952)	Spezifische Membrankapazität
$V$	-70	$mV$	(4),(11),(13)	(Kager et al., 2007)	Membranpotential
$C$	$c_m \cdot A$	$F$	(11),(12),(13)	-	Gesamtkapazität
$Q$	-	$C$	(11),(12),(13)	-	Gesamtladung

Tabelle 4: Kapazität und Spannung

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$P_{Cl}^0$	$40 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(5)	(Armstrong, 2003; Hodgkin and Horowicz, 1959)	basale Chloridpermeabilität
$P_K^0$	$20 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(5)	(Armstrong, 2003; Kager et al., 2007)	basale Kaliumpermeabilität
$P_{Na}^0$	$0.8 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(5)	(Armstrong, 2003; Hodgkin and Horowicz, 1959; Kager et al., 2007)	basale Natriumpermeabilität
$P_K^g$	$1000 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(5),(6)	(Cohen, 1973), gefittet	Permeabilität der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle
$P_{Na}^g$	$3500 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(5),(7)	(Cohen, 1973), gefittet	Permeabilität der spannungsgesteuerten Natriumkanäle

Tabelle 5: Permeabilitäten

	$C$	$\alpha$	$\beta$
$m$	1000	$\frac{0.1-0.01(V+60)}{\exp(1-0.1(V+60))-1}$	$0.125 \exp\left(\frac{-(V+65)}{80}\right)$
$n$	1000	$\frac{2.5-0.01(V+65)}{\exp(2.5-0.1(V+65))-1}$	$4.8 \exp\left(\frac{-(V+65)}{18}\right)$
$h$	1000	$0.07 \exp\left(\frac{-(V+65)}{20}\right)$	$\frac{1}{\exp((30-(V+75))/10)+1}$

Tabelle 6: HH-Übergangsraten (Hodgkin and Huxley, 1952)

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$n$	4	-	(9),(10)	(Zahler et al., 1997)	Hillkoeffizient
$k_{NaK}^{n=4}$	$2.304 \cdot 10^{-11}$	-	(9),(10)	gefittet	Ratenkonstante
$Na_c$	10	$mM$	(9),(10)	(Zahler et al., 1997)	Bindungskonstante

Tabelle 7: kinetische Parameter der Pumpe

Abbildung	$P_{Cl}^0 \left[ \frac{m}{s} \right]$	$\Delta P_{Na} \left[ \frac{m}{s} \right]$	$\frac{\Omega_{out}}{\Omega_c}$
3 A	$40 \cdot 10^{-9}$	$2.36 \cdot 10^{-9}$	10
5 A	$10 \cdot 10^{-9}$	$0.93 \cdot 10^{-9}$	100
5 B	$10 \cdot 10^{-9}$	$1.55 \cdot 10^{-9}$	100
7 A	$60 \cdot 10^{-9}$	$3.55 \cdot 10^{-9}$	10
7 B	$10 \cdot 10^{-9}$	$1.05 \cdot 10^{-9}$	10
8 A1	$40 \cdot 10^{-9}$	$2.36 \cdot 10^{-9}$	10
8 A2	$40 \cdot 10^{-9}$	$2.36 \cdot 10^{-9}$	2
8 B1	$40 \cdot 10^{-9}$	$2.36 \cdot 10^{-9}$	1000
8B2	$80 \cdot 10^{-9}$	$4.20 \cdot 10^{-9}$	1000

Tabelle 8: Parameter für die Abbildung in Kapitel 1

## Anhang Kapitel 2:

### Beschreibung des mathematischen Modells und der Modellparameter:

Das Modell ist im Wesentlichen mit dem Modell aus Kapitel 1 identisch. In Kurzfassung beschreibt das Modell das Verhalten des Membranpotentials  $V$ , der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ ,  $[X]_{\text{cell}}$  und  $[X]_{\text{out}}$ , wobei  $X \in \text{Na} / \text{K} / \text{Cl}$  ist, r nicht diffusiblen organischen zellulären Moleküle (die Biomasse)  $[B]$  und das Zellvolumen  $\Omega_{\text{cell}}$ . Ionentransport über die Zellmembran umfasst passive (= Leck-) Ströme  $I_X^p$  für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , einen einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$  Strom aufgrund von sekundär aktiven Transport von Metaboliten und Neurotransmitter -  $I_{\text{Na}}^{\text{met}}$ , aktiven Transport von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  durch die Na-K-ATPase -  $I_{\text{Na/K}}^a$ , und Ionenströme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  durch spannungsgesteuerte Kanäle, die durch ihre gesteuerte Permeabilität  $P_{\text{Na/K}}^g$  beschrieben werden. Erregung wird durch das Öffnen ligandengesteuerter Natriumkanäle (= exzitatorische Natriumpermeabilität  $\Delta P_{\text{Na}}$ ) erreicht. Osmotischer Druck zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum, beschrieben durch die Differenz in den Osmolaritäten  $O_{\text{in}}$  und  $O_{\text{out}}$  wird durch Wasseraustausch ausgeglichen. Der Anteil der sekundär aktiven Transportströme von  $\text{Na}^+$  (und  $\text{K}^+$ ) am Gesamtnatriumstrom in Ruhe (d.h. ohne AP Feuern) wird durch die Konstante  $k$  ausgedrückt. Das Skalieren der reinen Leckströme wird mit der Konstante  $\gamma$  beschrieben.

Das Gleichungssystem lautet:

$$\frac{d[X]_{\text{cell}}}{dt} = -\frac{I_X}{z_X F \Omega_{\text{cell}}} - \frac{[X]_{\text{cell}}}{\Omega_c} \frac{d\Omega_c}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{d[X]_{\text{out}}}{dt} = -\frac{I_X}{z_X F \Omega_{\text{out}}} - \frac{[X]_{\text{out}}}{\Omega_{\text{out}}} \frac{d\Omega_{\text{out}}}{dt} \quad (2)$$

$$I_X = I_X^a + I_X^p + I_X^{\text{met}} \quad (3)$$

$$U = \frac{V \cdot F}{1000 \cdot R \cdot T} \quad (4)$$

$$I_X^p = A \Pi_X U F z_X^2 \frac{[X]_{\text{cell}} \exp(z_X U) - [X]_{\text{out}}}{1 - \exp(z_X U)} \quad (5)$$

$$\Pi_X = \gamma \cdot P_X^0 + P_X^g + \Delta P_X \quad (6)$$

$$I_{\text{Na}}^{\text{met}} = k \cdot I_0 \cdot P_{\text{Na}}^{\text{met}} \quad (7)$$

$$P_K^g = m^4 P_K^{g0} \quad (8)$$

$$P_{\text{Na}}^g = n^3 h \cdot P_{\text{Na}}^{g0} \quad (9)$$

$$\frac{dg}{dt} = C_g (\alpha_g (1 - g) + \beta_g) \quad (10)$$

$$I_{K-ATPase}^a = 2F \frac{k_{NaK}}{\left(1 + \frac{Na_c}{[Na^+]_{sub}}\right)^n} \quad (11)$$

$$I_{Na-ATPase}^a = -3F \frac{k_{NaK}}{\left(1 + \frac{Na_c}{[Na^+]_{sub}}\right)^n} \quad (12)$$

$$C = c_m A = \frac{Q}{V} \quad (13)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C} \frac{dQ}{dt} - \frac{Q}{C^2} \frac{dC}{dt} \quad (14)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C} \sum_X \frac{dQ_X}{dt} = \frac{1}{C} \sum_X I_X \quad (15)$$

$$\frac{d\Omega_c}{dt} = P_W (O_{in} - O_{out}) \quad (16)$$

$$O_{in} = \sum_X (z_X [X]_{cell}) + [B] \quad (17)$$

$$O_{out} = \sum_X (z_X [X]_{out}) \quad (18)$$

### Parameter und Konstanten

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Beschreibung
T	293	K	(6)	Temperatur
R	8.3	$\frac{J}{mol \cdot K}$	(6)	Universelle Gaskonstante
F	96490	$\frac{C}{mol}$	(6),(11),(12)	Faradaykonstante

Tabelle 1: Konstanten

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Beschreibung
$r$	$25 \cdot 10^{-6}$	$m$	-	Zellradius
$A$	$4 \cdot \pi \cdot r^2$	$m^2$	(13)	Zelloberfläche
$\Omega_c$	$\frac{4}{3} \pi \cdot r^3$	$m^3$	(1)	Zellvolumen
$\Omega_{out}$	$\infty$	$m^3$	(2)	Extrazelluläres Volumen

Tabelle 2: Geometrie

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$[Cl]_{cell}$	8	$mM$	(1),(5),(17)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Chlorid Konz.
$[K]_{cell}$	140	$mM$	(1),(5),(17)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Kalium Konz.
$[Na]_{bcell}$	10	$mM$	(1),(5),(17)	(Armstrong, 2003)	zelluläre Natrium Konz.
$[Cl]_{out}$	150	$mM$	(2),(5),(18)	(Armstrong, 2003)	externe Chloride Konz.
$[K]_{out}$	4	$mM$	(2),(5),(18)	(Armstrong, 2003)	externe Kalium Konz.
$[Na]_{out}$	145	$mM$	(2),(5),(18)	(Armstrong, 2003)	externe Natrium Konz.
$[B]$	141	$mM$	(17)	(Armstrong, 2003)	impermeable Biomasse

Tabelle 3: Ionenkonzentrationen

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$c_m$	$10^{-6}$	$\frac{F}{m^2}$	(13)	(Hodgkin and Huxley, 1952)	Spezifische Membrankapazität
$V$	-70	$mV$	(4),(13)	(Kager et al., 2007)	Membranpotential
$C$	$c_m \cdot A$	$F$	(13),(14),(15)	-	Gesamtkapazität
$Q$	-	$C$	(13),(14),(15)	-	Gesamtladung

Tabelle 4: Kapazität und Spannung

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$P_{Cl}^0$	$\gamma \cdot 40 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(6)	(Armstrong, 2003; Hodgkin and Horowicz, 1959)	basale Chloridpermeabilität
$P_K^0$	$(\gamma \cdot (1 - k) + k) \cdot 20 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(6)	(Armstrong, 2003; Kager et al., 2007)	basale Kaliumpermeabilität
$P_{Na}^0$	$\gamma \cdot (1 - k) \cdot 0.8 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(6)	(Armstrong, 2003; Hodgkin and Horowicz, 1959; Kager et al., 2007)	basale Natriumpermeabilität
$P_K^g$	$\sigma_\gamma \cdot 1000 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(6),(8)	(Cohen, 1973), gefittet	Permeabilität der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle
$P_{Na}^g$	$\sigma_\gamma \cdot 3500 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m}{s}$	(6),(9)	(Cohen, 1973), gefittet	Permeabilität der spannungsgesteuerten Natriumkanäle
$I_0$	$4.4915 \cdot 10^{-10}$	$A$	(7)	Siehe Kapitel 2	metabolischer $Na^+$ Strom

Tabelle 5: Permeabilitäten

	$C$	$\alpha$	$\beta$
$m$	$C_{\gamma}^m$	$\frac{0.1-0.01(V+65)}{\exp(1-0.1(V+65))-1}$	$0.125 \exp\left(\frac{-(V+65)}{80}\right)$
$n$	$C_{\gamma}^n$	$\frac{2.5-0.01(V+65)}{\exp(2.5-0.1(V+65))-1}$	$4.0 \exp\left(\frac{-(V+65)}{18}\right)$
$h$	$C_{\gamma}^h$	$0.07 \exp\left(\frac{-(V+65)}{20}\right)$	$\frac{1}{\exp((30-(V+65))/10)+1}$

Tabelle 6: HH-Übergangsraten (Hodgkin and Huxley, 1952)

Name	Wert	Einheit	Gleichung	Referenz	Beschreibung
$n$	4	-	(11),(12)	(Zahler et al., 1997)	Hillkoeffizient
$k_{NaK}^{n=4}$	$2.304 \cdot 10^{-11}$	-	(11),(12)	gefittet	Ratenkonstante
$Na_c$	10	$mM$	(11),(12)	(Zahler et al., 1997)	Bindungskonstante

Tabelle 7: kinetische Parameter der Pumpe

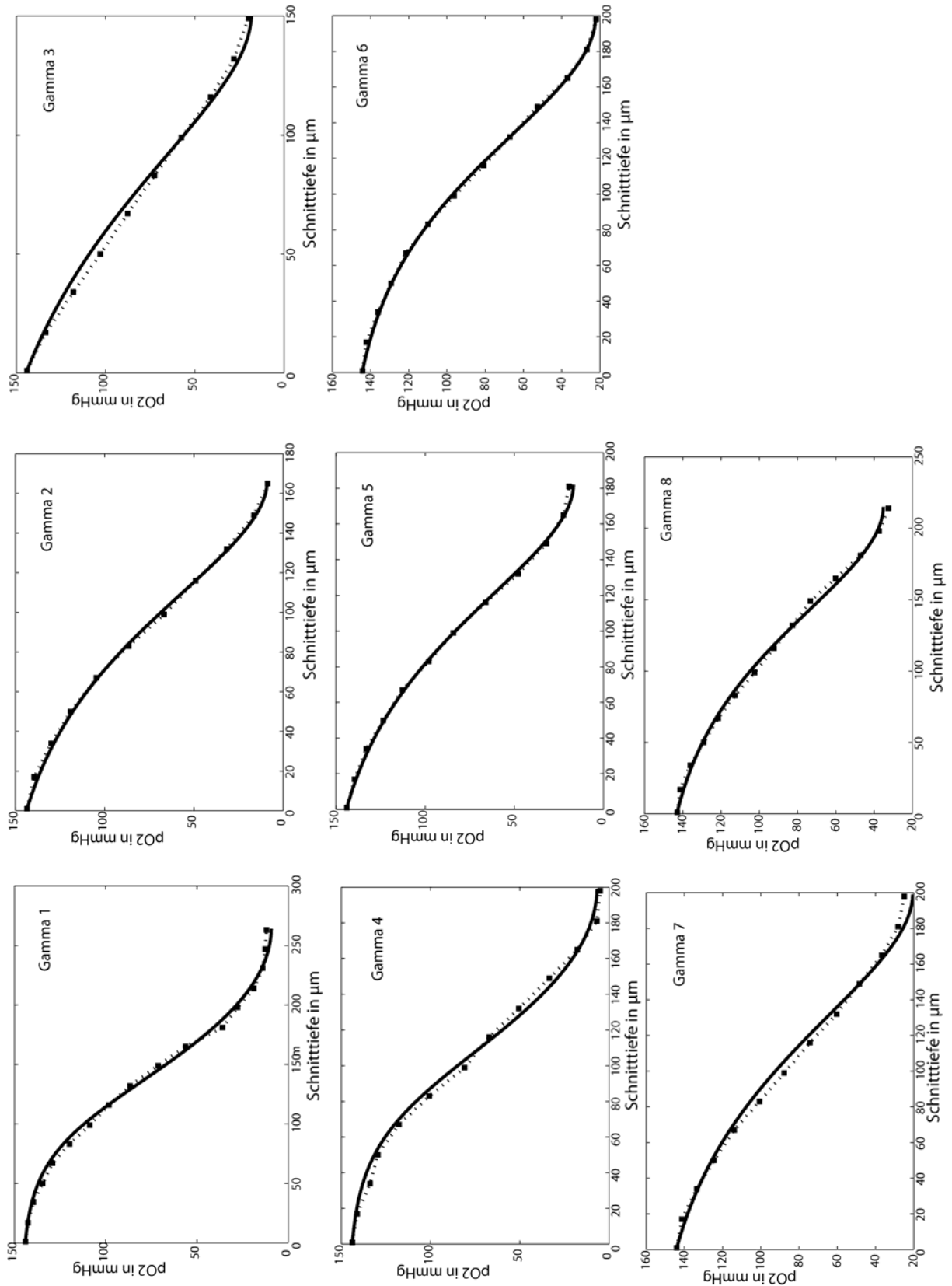
panel	$k$	$\gamma$	$\sigma_{\gamma}$	$C_{\gamma}^m$	$C_{\gamma}^n$	$C_{\gamma}^h$	$z^a$	$\Delta P_{Na}^{\min}$ in $\frac{m}{s}$
A1/B1	0.5	1	1	200	1000	500	2	$23 \cdot 10^{-10}$
A2/B2	0.5	0.1	0.3	300	1000	500	1	$7 \cdot 10^{-10}$
A3/B3	0.5	0.01	0.2	300	1000	500	1	$5 \cdot 10^{-10}$

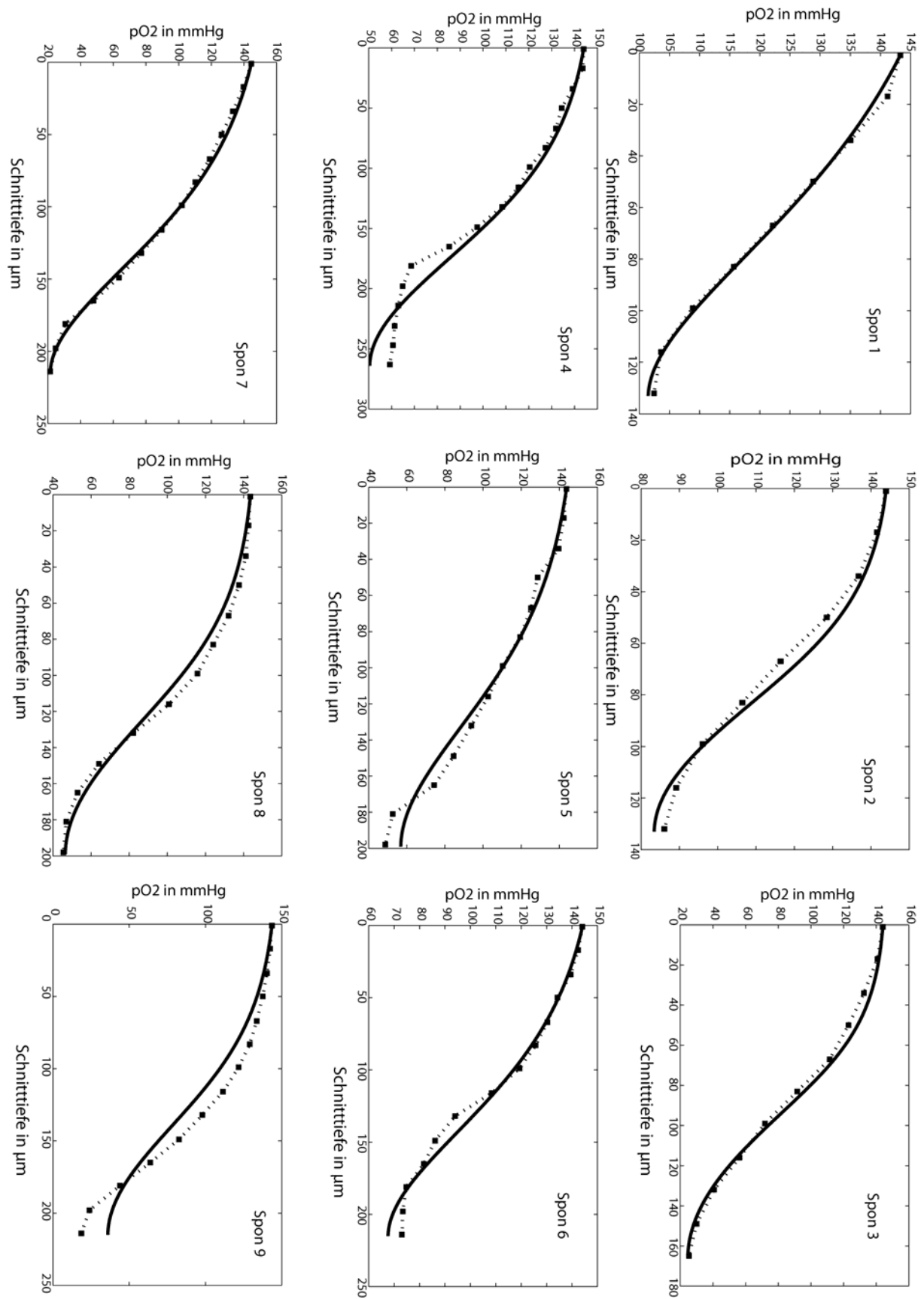
Tabelle 8: Parameter für Abbildung 4 in Kapitel 2

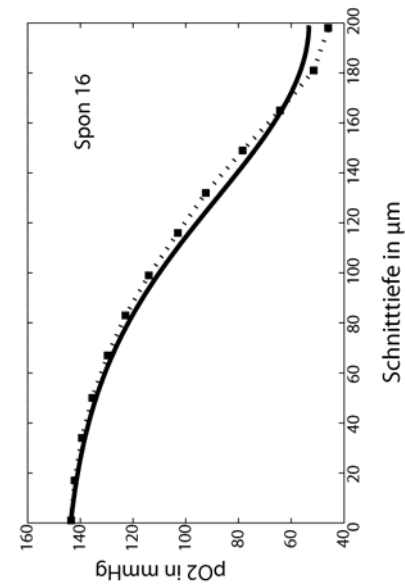
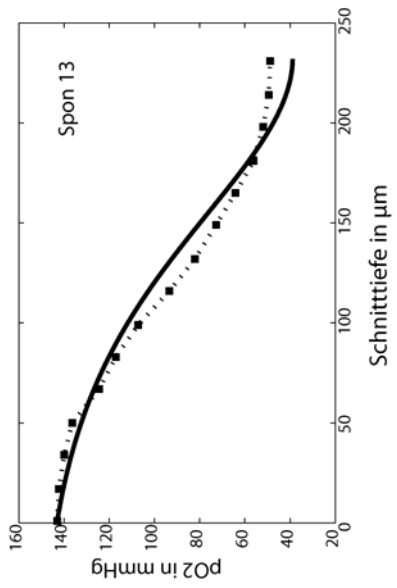
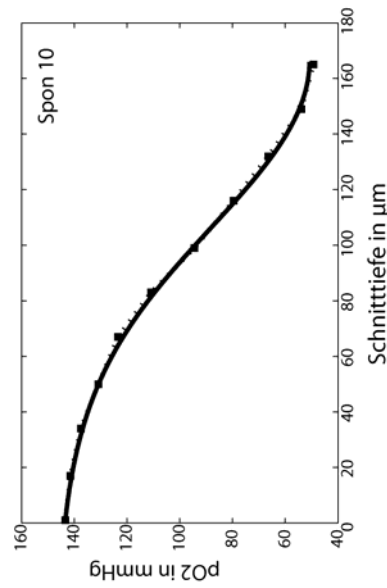
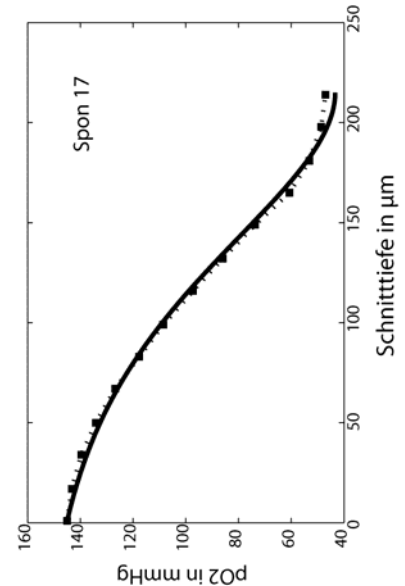
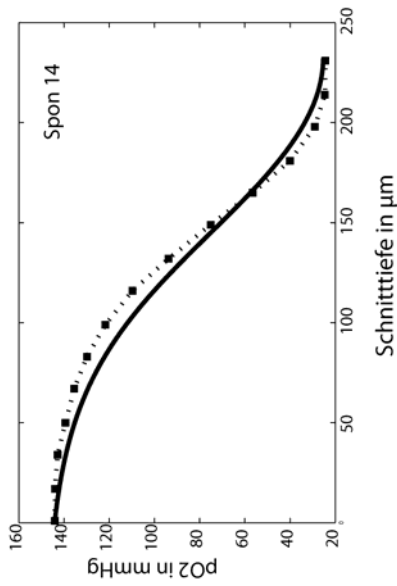
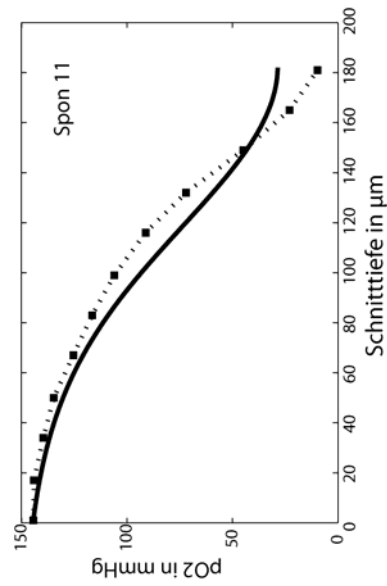
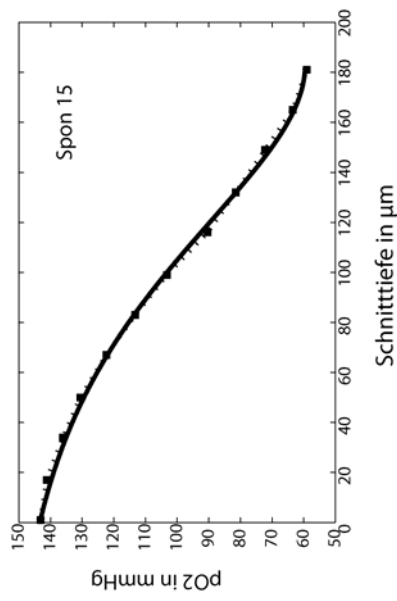
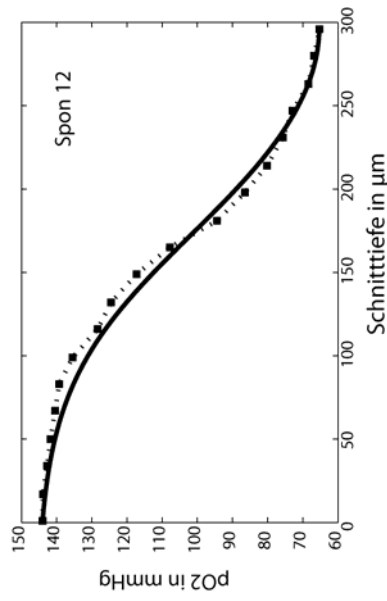


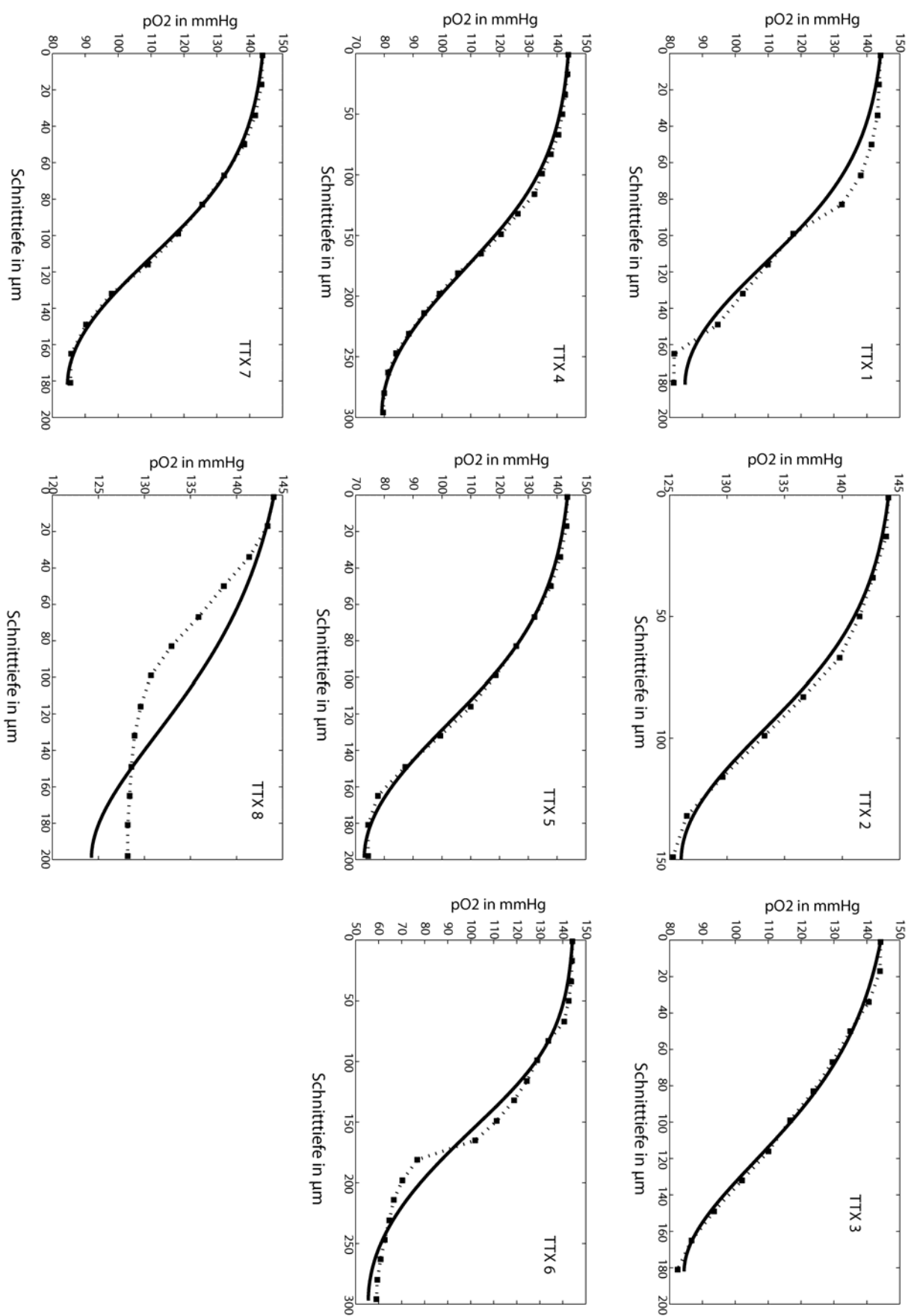
## Anhang Kapitel 3:

Alle Messergebnisse und zugehörige Fits für die 8 Messungen bei Gammaoszillation, 17 Messungen bei Spontanaktivität und 8 Messungen bei Zugabe von TTX.









## Anhang Kapitel 4:

### Glycolyse:

**Glucosetransporter: (Maher et al., 1996)**  
(glc\_ex <-> glc\_cyt)

$$v_{glc} = V_{\max-glct} \left( \frac{glc_{ext} - glc}{1 + \frac{glc}{K_m^{glc}} + \frac{glc_{ext}}{K_m^{glc_{ext}}}} \right)$$

$$V_{\max-glct} = 3$$

$$K_m^{glc} = 2.87$$

$$K_m^{glc_{ext}} = 2.87$$

**Hexokinase: (Thompson and Bachelar.Hs, 1970), (Garfinkel et al., 1987), (Purich and Fromm, 1971), (Chakraba.U and Kenkare, 1974)**  
(Glc + ATP -> Glc6P + ADP)

$$v_{hexk} = V_{\max-hexk} \left( \frac{glc}{glc + K_m^{glc}} \right) \left( \frac{atp}{atp + K_m^{atp} \left( 1 + \frac{glc6p}{K_{i-atp}^{glc6p}} \right)} \right) \left( 1 - \frac{glc6p}{K_i^{glc6p}} \right)$$

$$V_{\max-hexk} = 3.32$$

$$K_m^{glc} = 0.043$$

$$K_m^{atp} = 0.37$$

$$K_{i-atp}^{glc6p} = 0.074$$

$$K_i^{glc6p} = 0.1$$

**Glucose-6-phosphate Isomerase: (Gaitonde et al., 1989) ; Stryer (K<sub>eq</sub>)**  
(Glc6P <-> Fru6P)

$$v_{g6piso} = V_{\max-g6piso} \left( \frac{glc6p - \frac{fru6p}{K_{eq-g6piso}}}{1 + \frac{glc6p}{K_m^{glc6p}} + \frac{fru6p}{K_m^{fru6p}}} \right)$$

$$V_{\max-g6piso} = V_{\max-g6piso} = 2.49$$

$$K_{eq-g6piso} = 0.5038$$

$$K_m^{glc6p} = 0.593$$

$$K_m^{fru6p} = 0.095$$

**Phosphofructokinase I: (Vora et al., 1985), (Kasten et al., 1993), (Gekakis et al., 1994)**  
(Fru6P + ATP -> Fru16P + ADP)

$$v_{pfkl} = V_{\max-pfkl} \left( \frac{fru6p}{fru6p + K_m^{fru6p} \cdot \left( 1 - K_0 \frac{fru26p^{n_{fru26p}}}{fru26p^{n_{fru26p}} + (K_a^{fru26})^{n_{fru26p}}} \right)} \right) \left( \frac{atp}{atp + K_m^{atp}} \right) \left( 1 - \frac{atp^n}{atp^n + (K_i^{atp})^n} \right) \left( \frac{fru26p}{fru26p + K_a^{fru26p}} \right)$$

$$V_{\max-pfkl} = 4.399$$

$$K_m^{fru6p} = 0.111$$

$$K_m^{atp} = 0.04$$

$$n = 1.8$$

$$K_i^{atp} = 1.2$$

$$K_0 = 0.55$$

$$K_a^{fru26p} = 0.0042$$

$$n_{fru26p} = 5.5$$

$$K_a^{fru26p} = 0.005$$

**Phosphofructokinase II:** (Elmaghrabi et al., 1986), (Ventura et al., 1992), (Kessler and Eschrich, 2001), (Marsin et al., 2000), (Oakhill et al., 2010), (Oakhill et al., 2011),  
(Fru6P + ATP → Fru26P + ADP)

$$v_{pfkII} = V_{\max-pfkII} \left( \frac{fru6p}{fru6p + K_m^{fru6p}} \right) \left( \frac{atp}{atp + K_m^{atp}} \right) \left( \frac{amp}{amp + K_a^{amp}} \right) \left( \frac{adp}{adp + K_a^{adp}} \right)$$

$$V_{\max-pfkII} = 2.324 \cdot 10^{-4}$$

$$K_m^{fru6p} = 0.027$$

$$K_m^{atp} = 0.055$$

$$K_a^{amp} = 0.073$$

$$K_a^{adp} = 0.056$$

**Fructose-2,6- Bisphosphatase:** (Elmaghrabi et al., 1986), (Ventura et al., 1992)  
(Fru26P → Fru6P + Pi)

$$v_{fru26pp} = V_{\max-fru26pp} \left( \frac{fru26p}{fru26p + K_m^{fru26p} \left( 1 + \frac{fru6p}{K_i^{fru6p}} \right)} \right)$$

$$V_{\max-fru26pp} = 3.32 \cdot 10^{-3}$$

$$K_m^{fru26p} = 0.07$$

$$K_i^{fru6p} = 0.02$$

**Aldolase:** (Penhoet et al., 1969)  
(Fru16P ↔ Grap + Dhap)

$$v_{aldo} = V_{\max-ald} \left( \frac{fru16p - \frac{grap \cdot dhap}{K_{eq}^{aldo}}}{\left(1 + \frac{fru16p}{K_m^{fru16p}}\right) + \left(1 + \frac{grap}{K_m^{grap}}\right) \left(1 + \frac{dhap}{K_m^{dhap}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-ald} = 4.15 \cdot 10^7$$

$$K_{eq}^{aldo} = 0.0976$$

$$K_m^{fru16p} = 0.003$$

$$K_m^{grap} = 0.08$$

$$K_m^{dhap} = 0.03$$

**Triosephosphate Isomerase: (Guix et al., 2009)**  
(Dhap <-> Grap)

$$v_{tpi} = V_{\max-tpi} \left( \frac{dhap - \frac{grap}{K_{eq}^{tpi}}}{1 + \frac{dhap}{K_m^{dhap}} + \frac{grap}{K_m^{grap}}} \right)$$

$$V_{\max-tpi} = 8.3 \cdot 10^6$$

$$K_{eq}^{tpi} = 0.0545$$

$$K_m^{dhap} = 0.84$$

$$K_m^{grap} = 1.65$$

**Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase / Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase: (Ryzlak and Pietruszko, 1987), (Kish et al., 1998), (Schuster and Holzhutter, 1995)**  
(Grap + Pi + NAD -> Bpg13 + NADH)

$$v_{gapdh} = V_{\max-gapdh} \left( \frac{nad \cdot grap \cdot pi - \frac{bpg13 \cdot nadh}{K_{eq}^{gapdg}}}{\left(1 + \frac{nad}{K_m^{nad}}\right) \left(1 + \frac{grap}{K_m^{grap}}\right) \left(1 + \frac{pi}{K_m^{pi}}\right) + \left(1 + \frac{nadh}{K_m^{nadh}}\right) \left(1 + \frac{bpg13}{K_m^{bpg13}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-gapdh} = 498$$

$$K_{eq}^{gapdh} = 0.0868$$

$$K_m^{nad} = 0.01$$

$$K_m^{nad} = 0.027$$

$$K_m^{grap} = 0.101$$

$$K_m^{pi} = 3.9$$

$$K_m^{nadh} = 0.008$$

$$K_m^{bpg13} = 0.0035$$

**Phophoglycerade Kinase: (Sharma and Rothstein, 1984)**  
(Bgp13 + ADP <-> Pg3 + ATP)

$$v_{pgk} = V_{\max-pgk} \left( \frac{bpg13 \cdot adp - \frac{pg3 \cdot atp}{K_{eq}^{pgk}}}{\left(1 + \frac{bpg13}{K_m^{bpg13}}\right) \left(1 + \frac{adp}{K_m^{adp}}\right) + \left(1 + \frac{pg3}{K_m^{pg3}}\right) \left(1 + \frac{atp}{K_m^{atp}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-pg} = 1752$$

$$K_{eq}^{pgk} = 1310$$

$$K_m^{bpg13} = 0.063$$

$$K_m^{adp} = 0.42$$

$$K_m^{pg3} = 0.67$$

$$K_m^{atp} = 0.25$$

**Phosphoglycerate Mutase: (Batke et al., 1988), (Ikura et al., 1978)**  
(Pg3 <-> Pg2)

$$v_{pgm} = V_{\max-pgm} \left( \frac{pg3 - \frac{pg2}{K_{eq}^{pgm}}}{\left(1 + \frac{pg3}{K_m^{pg3}}\right) + \left(1 + \frac{pg2}{K_m^{pg2}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-pgm} = 1660$$

$$K_{eq}^{pgm} = 0.1814$$

$$K_m^{pg3} = 0.22$$

$$K_m^{pg2} = 0.28$$

**Enolase: (Suzuki et al., 1980)**  
(Pg2 <-> Pep)

$$v_{eno} = V_{\max-eno} \left( \frac{pg2 - \frac{pep}{K_{eq}^{eno}}}{\left(1 + \frac{pg2}{K_m^{pg2}}\right) + \left(1 + \frac{pep}{K_m^{pep}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-eno} = 24.9 \cdot 10^3$$

$$K_{eq}^{eno} = 0.5$$

$$K_m^{pg2} = 0.05$$

$$K_m^{pep} = 0.15$$

**Pyruvate Kinase: (Srivastava and Baquer, 1985), (Schwark et al., 1971)**  
(Pep + ADP -> Pyr + ATP)

$$v_{pk} = V_{\max-pk} \left( \frac{pep}{pep + K_m^{pep}} \right) \left( \frac{adp}{adp + K_m^{adp} \left(1 + \frac{atp}{K_i^{atp}}\right)} \right)$$

$$V_{\max-pk} = 2.739$$



$$K_m^{pep} = 0.074$$

$$K_m^{adp} = 0.42$$

$$K_i^{atp} = 4.4$$

**Lactatdehydrogenase:** (Bonavita et al., 1966), (Kocha et al., 1990), (Nisselbaum et al., 1964)  
(Pyr + NADH ↔ Lac + NAD)

$$v_{ldh} = V_{\max-ldh} \left( \frac{pyr \cdot nadh - \frac{lac \cdot nad}{K_{eq}^{ldh}}}{\left(1 + \frac{pyr}{K_m^{pyr}}\right) \left(1 + \frac{nadh}{K_m^{nadh}}\right) + \left(1 + \frac{lac}{K_m^{lac}}\right) \left(1 + \frac{nad}{K_m^{nad}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-ldh} = 150$$

$$K_m^{pyr} = 0.36$$

$$K_m^{nadh} = 0.043$$

$$K_m^{lac} = 4.2$$

$$K_m^{nad} = 0.088$$

**MCT :** (Nedergaard et al., 1991), (McKenna et al., 1998)  
(Lac<sub>cyt</sub> ↔ Lac<sub>ex</sub>)

$$v_{mct} = V_{\max-mct} \left( \frac{lac - \frac{lac_{ex}}{K_{eq}^{mct?}}}{\left(1 + \frac{lac}{K_m^{lac}}\right) + \left(1 + \frac{lac_{ex}}{K_m^{lac_{ex}}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-mct} = 0.1$$

$$K_{eq}^{mct} = \frac{h_{cyt}}{h_{ext}} = 1.737$$

$$K_m^{lac} = 1.1$$

$$K_m^{lac_{ex}} = 1.1$$

**Creatinkinase:** (Merrill and Guynn, 1976)  
(ATP + Cr ↔ ADP + CrP)

$$v_{ck} = V_{\max-ck} \left( \frac{adp \cdot crp - \frac{atp \cdot cr}{K_{eq-app}^{ck}}}{1} \right)$$

$$V_{\max-ck} = 0.0473$$

$$K_{eq-app}^{ck} = 7$$

Die effektive Gleichgewichtskonstante ist kleiner als die thermodynamische Gleichgewichtskonstante, was auch für Muskelzellen bekannt ist (Sahlin et al., 1975).

## Malate-Aspartate- Shuttle:

**Zytosolische Malatdehydrogenase:** (Malik et al., 1993), (Mueggler and Wolfe, 1978), (Gelpi et al., 1992)  
(Mal<sub>in</sub> + NAD<sub>in</sub> ↔ Oa<sub>in</sub> + NADH<sub>in</sub>)

$$v_{mdh}^{cyt} = V_{\max-mdh}^{cyt} \left( \frac{mal \cdot nad - \frac{oa \cdot nadh}{K_{eq}^{mdh}}}{\left(1 + \frac{mal}{K_m^{mal}}\right) \left(1 + \frac{nad}{K_m^{nad}}\right) + \left(1 + \frac{oa}{K_m^{oa}}\right) \left(1 + \frac{nadh}{K_m^{nadh}}\right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-mdh}^{cyt} = 5.5 \cdot 10^6$$

$$K_{eq}^{mdh} = 10^{-4}$$

$$K_m^{nad} = 0.05$$

$$K_m^{mal} = 0.77$$

$$K_m^{oa} = 0.04$$

$$K_m^{nadh} = 0.05$$

**mitochondriale Malatedehydrogenase**  
(Mal<sub>mito</sub> + NAD<sub>mito</sub> ↔ Oa<sub>mito</sub> + NADH<sub>mito</sub>)

siehe TCAC.

**Cytosolische Aspartataminotransferase: (Kishore et al., 1998)**  
(Asp<sub>cyt</sub> + akg<sub>cyt</sub> ↔ oa<sub>cyt</sub> + glu<sub>cyt</sub>)

$$v_{aat}^{cyt} = V_{\max-aat}^{cyt} \left( asp \cdot akg - \frac{oa \cdot glu}{K_{eq}^{aat}} \right)$$

$$V_{\max-aat}^{cyt} = 5.5 \cdot 10^4$$

$$K_{eq}^{aat} = 0.147$$

**mitochondriale Aspartataminotransferase: (Kishore et al., 1998)**  
(Asp<sub>mito</sub> + akg<sub>mito</sub> ↔ oa<sub>mito</sub> + glu<sub>mito</sub>)

$$v_{aat}^{mito} = V_{\max-aat}^{mito} \left( asp \cdot akg - \frac{oa \cdot glu}{K_{eq}^{aat}} \right)$$

$$V_{\max-aat}^{mito} = 5.5 \cdot 10^4$$

$$K_{eq}^{aat} = 0.147$$

**Aspartate-Glutamate carrier: (Dierks et al., 1988)**  
(Asp<sub>mito</sub> + glu<sub>cyt</sub> + h<sub>cyt</sub> ↔ Asp<sub>cyt</sub> + glu<sub>mito</sub> + h<sub>mito</sub>)

$$v_{asp-glu-c.} = V_{\max-asp-glu-c.} \left( \frac{asp_{mito} \cdot glu_{cyt} - \frac{asp_{cyt} \cdot glu_{mito}}{K_{eq}^{asp-glu-c.}}}{\left(asp_{mito} + K_m^{asp_{mito}}\right) \left(glu_{cyt} + K_m^{glu_{cyt}}\right) + \left(asp_{cyt} + K_m^{asp_{cyt}}\right) \left(glu_{mito} + K_m^{glu_{mito}}\right)} \right)$$

$$V_{\max-asp-glu-c.} = 5.5$$

$$K_{eq}^{asp-glu-c.} = -V_{mm} + \frac{1000 \cdot R \cdot T}{F} \log \left( \frac{h_{cyt}}{h_{mito}} \right)$$

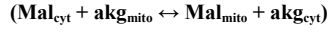
$$K_m^{asp_{mito}} = 0.05$$

$$K_m^{glu_{cyt}} = 2.8$$

$$K_m^{asp_{cyt}} = 0.05$$

$$K_m^{glu_{mito}} = 2.8$$

**Malate-akg-carrier: (De Palma et al., 2010), (Indiveri et al., 1991)**



$$v_{mal-akg-c.} = V_{\max-mal-akg-c.} \cdot \left( \frac{mal_{cyt} \cdot akg_{mito} - mal_{mito} \cdot akg_{cyt}}{\left(mal_{cyt} + K_m^{mal_{cyt}}\right)\left(akg_{mito} + K_m^{akg_{mito}}\right) + \left(mal_{mito} + K_m^{mal_{mito}}\right)\left(akg_{cyt} + K_m^{akg_{cyt}}\right)} \right)$$

$$V_{\max-mal-akg-c.} = 5.5 \cdot 10^5$$

$$K_m^{mal_{cyt}} = 1.36$$

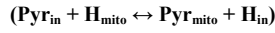
$$K_m^{akg_{cyt}} = 0.1$$

$$K_m^{mal_{mito}} = 0.71$$

$$K_m^{akg_{mito}} = 0.2$$

## TCAC

**Pyruvattransporter: (Halestrap, 1975)**



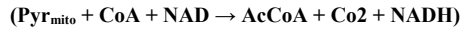
$$v_{Pyr-transporter} = V_{\max}^{Pyr-transporter} \cdot \frac{(Pyr_{in} \cdot H_{in} - Pyr_{mito} \cdot H_{mito})}{\left(1 + \frac{Pyr_{in}}{K_m^{Pyr_{in}}}\right)\left(1 + \frac{Pyr_{mito}}{K_m^{Pyr_{mito}}}\right)}$$

$$V_{\max}^{Pyr-transporter} = 1.65 \cdot 10^4$$

$$K_m^{Pyr_{in}} = 0.15$$

$$K_m^{Pyr_{mito}} = 0.15$$

**Pyruvatedehydrogenasekomplex: (Blass and Lewis, 1973), (Land and Clark, 1973)**



$$v_{pdhc} = V_{\max}^{pdhc} \left( 1 + A_{\max}^{Ca_{mito}} \frac{Ca_{mito}}{Ca_{mito} + K_a^{Ca_{mito}}} \right) \left( \frac{Pyr_{mito}}{Pyr_{mito} + K_m^{Pyr}} \right) \left( \frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD_{mito}}} \right) \left( \frac{CoA_{mito}}{CoA_{mito} + K_m^{CoA_{mito}}} \right)$$

$$V_{\max}^{pdhc} = 110$$

$$A_{\max}^{Ca_{mito}} = 1.7$$

$$K_a^{Ca_{mito}} = 10^{-3}$$

$$K_m^{Pyr} = 0.068$$

$$K_m^{NAD_{mito}} = 0.036$$

$$K_m^{CoA_{mito}} = 0.0047$$

**Citratsynthase: (Matsuoka and Srere, 1973),**



$$v_{cs} = V_{\max}^{cs} \left( \frac{Oxa_{mito}}{Oxa_{mito} + K_m^{Oxa} \left( 1 + \frac{Cit_{mito}}{K_i^{Cit}} \right)} \right) \left( \frac{AcCoA_{mito}}{AcCoA_{mito} + K_m^{AcCoA} \cdot \left( 1 + \frac{CoA_{mito}}{K_i^{CoA}} \right)} \right)$$

$$V_{\max}^{cs} = 110$$

$$K_m^{Oxa} = 0.0045$$

$$K_i^{Cit} = 3.7$$

$$K_m^{accoa} = 0.05$$

$$K_i^{CoA} = 0.025$$

**Aconitase: (Guarriero-Bobyleva et al., 1973),**

**(Cit ↔ IsoCit)**

$$v_{Aco} = V_{\max}^{Aco} \frac{Cit_{mito} - \frac{IsoCit_{mito}}{K_{eq}^{Aco}}}{1 + \frac{Cit_{mito}}{K_m^{Cit}} + \frac{IsoCit_{mito}}{K_m^{IsoCit}}}$$

$$V_{\max}^{Aco} = 2.75 \cdot 10^5$$

$$K_{eq}^{Aco} = 0.067$$

$$K_m^{Cit} = 0.48$$

$$K_m^{isocit} = 0.12$$

$$K_m^{IsoCit} = 0.12$$

**NAD-abhängige Isocitratdehydrogenase: (Rutter and Denton, 1988), (Willson and Tipton, 1980), (Rutter and Denton, 1989), (Willson and Tipton, 1979), (Lai and Clark, 1978)**

**(IsoCit + NAD → akg + NADH)**

$$v_{icdh} = V_{\max}^{icdh} \left( \frac{IsoCit_{mito}^{n^{IsoCit}}}{IsoCit_{mito}^{n^{IsoCit}} + (K_m^{IsoCit})^{n^{IsoCit}}} \right) \left( \frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD} \cdot \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_i^{NADH}} \right)} \right)$$

$$V_{\max}^{icdh} = 11$$

$$n^{IsoCit} = 1.9$$

$$K_m^{IsoCit} = \frac{K_{m1}^{IsoCit}}{\left( 1 + \left( \frac{Ca_{mito}}{K_a^{Ca}} \right)^{n^{Ca}} \right)} + K_{m2}^{IsoCit}$$

$$K_{m1}^{IsoCit} = 0.11$$

$$K_{m2}^{IsoCit} = 0.06$$

$$K_a^{Ca} = 0.0074 \quad K_a^{ca} = 0.0074$$

$$n^{ca} = 2$$

$$n^{Ca} = 2 \quad K_m^{NAD} = 0.091$$

$$K_i^{NADH} = 0.041$$

$\alpha$ -ketoglutaratdehydrogenasekomplex (Faff-Michalak and Albrecht, 1993; Lai and Cooper, 1986; Luder et al., 1990; McCormack and Denton, 1979; Smith et al., 1974), (Lai and Cooper, 1986), (Luder et al., 1990), (Smith et al., 1974),

( $akg + NAD + CoA \rightarrow SucCoA + NADH$ )

$$v_{akdhc} = V_{\max}^{akdhc} \left( 1 - \frac{Ca_{mito}}{Ca_{mito} + K_i^{Ca}} \right) \left( \frac{akg_{mito}}{akg_{mito} + K_m^{akdhc}} \right) \left( \frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD} \cdot \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_i^{NADH}} \right)} \right) \left( \frac{CoA}{CoA + K_m^{CoA} \cdot \left( 1 + \frac{SucCoA}{K_i^{SucCoA}} \right)} \right)$$

$$V_{\max}^{akdhc} = 7.15$$

$$K_m^{akdhc} = \left( \frac{K_{m1}^{akdhc}}{\left( 1 + \frac{Ca_{mito}}{K_i^{Ca}} \right)} + K_{m2}^{akgh} \right) \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_{i-akg}^{NADH}} \right)$$

$$K_{m1}^{akdhc} = 2.5$$

$$K_m^{NAD} = 0.021$$

$$K_i^{NADH} = 0.0045$$

$$K_m^{CoA} = 0.0013$$

$$K_i^{SucCoA} = 0.0045$$

Succinyl-CoA Synthetase (Phillips et al., 2009), (Johnson et al., 1998), (Krivanek and Novakova, 1991), (Lynn and Guynn, 1978)

( $SucCoA + ADP + P \leftrightarrow Succ + CoA + ATP$ )

$$v_{succoas-atp} = V_{\max-succoas-atp} \left( 1 + A_{\max}^P \cdot \left( \frac{P_{mito}^{n^P}}{P_{mito}^{n^P} + (K_m^P)^{n^P}} \right) \right) \left( \frac{SucCoA_{mito} \cdot ADP_{mito} \cdot P_{mito} - \frac{Succ_{mito} \cdot CoA_{mito} \cdot ATP_{mito}}{K_{eq-succoas}}}{\left( 1 + \frac{SucCoA_{mito}}{K_m^{SucCoA}} \right) \left( 1 + \frac{ADP_{mito}}{K_m^{ADP}} \right) \left( 1 + \frac{P_{mito}}{K_m^P} \right) + \left( 1 + \frac{Succ_{mito}}{K_m^{Succ}} \right) \left( 1 + \frac{CoA_{mito}}{K_m^{CoA}} \right) \left( 1 + \frac{ATP_{mito}}{K_m^{ATP}} \right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-succoas-atp} = 2.2 \cdot 10^4$$

$$K_{eq-succoas} = 3.63$$

$$A_{\max}^P = 1.2$$

$$n^P = 3$$

$$K_m^{SucCoA} = 0.041$$

$$K_m^{ADP} = 0.25$$

$$K_m^P = 0.72$$

$$K_m^{Succ} = 1.6$$

$$K_m^{CoA} = 0.056$$

$$K_m^{ATP} = 0.017$$

**Succinatdehydrogenase (Vinogradov et al., 1989), (Gutman and Silman, 1975)**

**(Succ + Q ↔ Fum + QH<sub>2</sub>)**

$$v_{succdh} = V_{\max-succdh} \left( \frac{Succ_{mito} \cdot Q_n - \frac{Fum_{mito} \cdot (QH_2)_n}{K_{eq-succdh}}}{Succ_{mito} + K_m^{Succ} \left( 1 + \frac{Mal_{mito}}{K_i^{Mal}} \right)} \right)$$

$$V_{\max-succdh} = 1.1 \cdot 10^4$$

$$K_{eq-succdh} = \exp\left(\frac{25 \cdot F}{R \cdot T}\right)$$

$$K_m^{Succ} = 1.6$$

$$K_i^{Mal} = 2.2$$

**Fumerase (Bock and Alberty, 1953; Kobayashi et al., 1981)**

**(Fum <-> Mal)**

$$v_{fum} = V_{\max-fum} \left( \frac{Fum_{mito} - \frac{Mal_{mito}}{K_{eq-fum}}}{1 + \frac{Fum_{mito}}{K_m^{Fum}} + \frac{Mal_{mito}}{K_m^{Mal}}} \right)$$

$$V_{\max-fum} = 1.1 \cdot 10^7$$

$$K_{eq-fum} = 4.4$$

$$K_m^{Fum} = 0.14$$

$$K_m^{Mal} = 0.3$$

**Malatdehydrogenase (Lai and Clark, 1978), (Gelpi et al., 1992), (Jespersen, 1976)**

**(Mal + NAD ↔ Oxa + NADH)**

$$v_{mdh} = V_{\max-mdh} \left( \frac{Mal_{mito} \cdot NAD_{mito} - \frac{Oxa_{mito} \cdot NADH_{mito}}{K_{eq-mdh}}}{\left( 1 + \frac{Mal_{mito}}{K_m^{Mal}} \right) \left( 1 + \frac{NAD_{mito}}{K_m^{NAD}} \right) + \left( 1 + \frac{Oxa_{mito}}{K_m^{Oxa}} \right) \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_m^{NADH}} \right) - 1} \right)$$

$$V_{\max-mdh} = 5.5 \cdot 10^6$$

$$K_{eq-mdh} = 1.2 \cdot 10^{-3}$$

$$K_m^{Mal} = 0.145$$

$$K_m^{NAD} = 0.06$$

$$K_m^{Oxa} = 0.017$$

$$K_m^{NADH} = 0.044$$

## Atmungskette:

**Komplex I : (Brown and Brand, 1988),**  
 $(NADH + Q + 4 H_{mito} \leftrightarrow NAD + QH_2 + 4 H_{in})$

$$v_{cx1} = V_{\max}^{cx1} \left( NADH \cdot Q - \frac{NAD \cdot QH_2}{K_{c1}^{eq}} \right)$$

$$V_{\max}^{cx1} = 4.5$$

$$K_{c1}^{eq} = \exp \left( \frac{-2 \cdot E_{0NAD/NADH} + 2 \cdot E_{0Q/QH_2} + 4 \cdot V_{mm}}{F \cdot R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^4$$

$$E_{0NAD/NADH} = -320 \text{ mV}$$

$$E_{0Q/QH_2} = 87 \text{ mV}$$

**Komplex III: (Brown and Brand, 1988)**

$$v_{cx3} = V_{\max}^{cx3} \left( QH_2 \cdot cytC_{ox}^2 - \frac{Q \cdot cytC_{red}^2}{K_{c3}^{eq}} \right)$$

$$V_{\max}^{cx3} = 4.5 \cdot 10^3$$

$$K_{c3}^{eq} = \exp \left( \frac{-2 \cdot E_{0Q/QH_2} + 2 \cdot E_{0cytC_{ox}/cytC_{red}} + 2 \cdot V_{mm}}{F \cdot R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^4$$

$$E_{0Q/QH_2} = 87 \text{ mV}$$

$$E_{0cytC_{ox}/cytC_{red}} = 221 \text{ mV}$$

**Komplex IV (Long et al., 2009), (Arnold and Kadenbach, 1999), (Napiwotzki and Kadenbach, 1998)**  
 $(2 \text{ cyt}_{red} + O_2 + 4 H_{mito} \rightarrow H_2O + 2 \text{ cyt}_{ox} + 2 H_{in})$

$$v_{C_4} = V_{\max}^{Cx4} \cdot \frac{cytC_{red}^n}{cytC_{red}^n + (K_m^{cytC_{red}})^n} \cdot \frac{O_{2mito}}{O_{2mito} + K_m^{O_2}} \cdot \left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^6$$

$$K_m^{O_2} = 0.001$$

$$n = A + B \frac{\left( \frac{ATP_{mito}}{ADP_{mito}} \right)^k}{\left( \frac{ADP_{mito}}{ADP_{mito}} \right)^k + \left( K_n^{\frac{ATP}{ADP}} \right)^k}$$

$$A = 1.1$$

$$B = 0.8$$

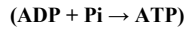
$$K_n^{\frac{ATP}{ADP}} = 24$$

$$k = 2.3$$

Der Faktor  $\left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^6$  wurde eingeführt, um eine ausreichende Aktivierung der Atmungskette zu erreichen.

## Oxidative Phosphorylierung:

ATP-Synthetase (Berg et al., 2007; Junge et al., 1970)



$$v_{syn} = V_{max}^{syn} \cdot \left( ADP_{mito} \cdot P_{mito} - \frac{ATP_{mito}}{K_{eq-syn}} \right)$$

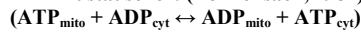
$$V_{max}^{syn} = 0.433$$

$$K_{eq-syn} = \exp\left(\frac{dG_0^{syn}}{R \cdot T} - k \cdot U\right) \cdot \left(\frac{h_{cyt}}{h_{mito}}\right)^k$$

$$dG_0^{syn} = 30500$$

$$k = 3$$

ATP-Austauscher: (Bohnsack, 1982)



$$v_{ATP-Austauscher} = V_{max}^{ATP-Austauscher} \cdot \left( \frac{1 - \frac{ATP_{in} \cdot ADP_{mito}}{ADP_{in} \cdot ATP_{mito}} \exp(U)}{\left( 1 + \frac{ATP_{in}}{ADP_{in}} \exp(S_{V_{mm}} \cdot U) \left( 1 + \frac{ADP_{mito}}{ATP_{mito}} \right) \right)} \right)$$

$$V_{max}^{ATP-Austauscher} = 3.47$$

$$S_{V_{mm}} = 0.3$$

## ATP-consumption

Der ATP Verbrauch wird mit einer Gleichung vom Michaelis-Menten-Typ mit niedrigem  $K_m$ -Wert für ATP modelliert:

$$v_{ATP-use} = V_{max-ATP-use} \frac{ATP_{in}}{ATP_{in} + K_m^{ATP}}$$

$$K_m^{ATP} = 0.1$$

## Elektrophysiology:

$$U = \frac{V_{mm} \cdot F}{1000 \cdot R \cdot T}$$

$$F = 96490.0 \frac{C}{mol}$$

$$R = 8.314 \frac{J}{K \cdot mol}$$

$$T = 310 \text{ K}$$

Elektrodiffusion:



Der passive Ausfluss von Natriumionen, Kaliumionen, Chloridionen und Protonen wird durch eine Goldman-Hodgkin Gleichung beschrieben:

**Kalium (Nicolli et al., 1991)**

$$I_{Pot_{mito}}^{ed} = A_m \cdot P_{Pot_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{K_{in} - K_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{Pot_{mito}} = 2 \cdot 10^{-10} \frac{m}{s}$$

**Natrium**

$$I_{Na_{mito}}^{ed} = A_m \cdot P_{Na_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{Na_{in} - Na_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{Na_{mito}} = 1 \cdot 10^{-11} \frac{m}{s} \quad (5 \text{ Prozent vom Kalium})$$

**Protonen: (Rolfe et al., 1994), (Krishnamoorthy and Hinkle, 1984)**

$$I_{H_{mito}}^{ed} = -A_m \cdot P_{H_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{H_{in} - H_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{H_{mito}} = 4 \cdot 10^{-4} \frac{m}{s}$$

**Pumpen: (Bernardi, 1999)**

Das Pumpen von Natrium, Kalium und Phosphat wird mittels des elektroneutralen protonengetriebenen Antiport beschrieben:

$$v_{Phos-Pumpe} = V_{\max}^{Phos-Pumpe} (P_{in} \cdot H_{in} - P_{mito} \cdot H_{mito})$$

$$I_{Na_{mito}}^{Pumpe} = V_{\max}^{Na-Pumpe} (Na_{in} \cdot H_{mito} - Na_{mito} \cdot H_{in})$$

$$I_{Pot_{mito}}^{Pumpe} = V_{\max}^{Pot-Pumpe} (K_{in} \cdot H_{mito} - K_{mito} \cdot H_{in})$$

Protonen werden durch die entsprechenden Prozesse in Komplex I, Komplex III und Komplex IV gepumpt:

$$I_{H_{mito}}^{Pumpe} = -(4v_{cx1} + 2v_{cx2} + 2v_{cx4})$$

**Ströme:**

$$I_{Na_{mito}} = I_{Na_{mito}}^{Pumpe} + I_{Na_{mito}}^{ed}$$

$$I_{Pot_{mito}} = I_{Pot_{mito}}^{Pumpe} + I_{Pot_{mito}}^{ed}$$

$$I_{H_{mito}} = I_{H_{mito}}^{ed} + I_{H_{mito}}^{Pumpe} + I_{Na_{mito}}^{Pumpe} + I_{Pot_{mito}}^{Pumpe} + v_{Phos-Pumpe} + 3 \cdot v_{syn}$$

**Membranpotential:**

Die mitochondriale Membrane wird folgendermaßen als Kondensator modelliert:

$$v_{V_{mn}} = \frac{1}{c_m \cdot A_m} \left( -I_C + I_K + I_H + I_{Na} - v_{Phos-exchanger} + v_{ATP-exchanger} \right)$$

$$c_m = 0.9 \cdot 10^{-6} \frac{Farad}{cm^2}$$

## Anhang Kapitel 5:

### Oxidative phosphorylation:

ATP-Synthetase (Berg et al., 2007; Junge et al., 1970)

(ATP → ADP + Pi)

$$v_{syn} = V_{\max}^{syn} \cdot \left( ADP_{mito} \cdot P_{mito} - \frac{ATP_{mito}}{K_{eq-syn}} \right)$$

$$K_{eq-syn} = \exp\left(\frac{dG_0^{syn}}{R \cdot T} - k \cdot U\right) \cdot \left(\frac{h_{cyt}}{h_{mito}}\right)^k$$

$$dG_0^{syn} = 30500$$

$$k = 3$$

ATP-Austauscher: (Bohnensack, 1982)

(ATP\_mito + ADP\_cyt ↔ ADP\_mito + ATP\_cyt)

$$v_{ATP-exchanger} = V_{\max}^{ATP-exchanger} \cdot \left( \frac{1 - \frac{ATP_{in} \cdot ADP_{mito}}{ADP_{in} \cdot ATP_{mito}} \exp(U)}{\left( 1 + \frac{ATP_{in}}{ADP_{in}} \exp(S_{V_{mm}} \cdot U) \left( 1 + \frac{ADP_{mito}}{ATP_{mito}} \right) \right)} \right)$$

$$S_{V_{mm}} = 0.3$$

### ATP-Verbrauch

Der ATP-Verbrauch wird als Michaelis-Menten Gleichung mit niedrigem  $K_m$ -Wert modelliert:

$$v_{ATP-use} = V_{\max-ATP-use} \frac{ATP_{in}}{ATP_{in} + K_m^{ATP}}$$

$$K_m^{ATP} = 0.1$$

### Elektrophysiologie:

$$U = \frac{V_{mm} \cdot F}{1000 \cdot R \cdot T}$$

$$F = 96490.0 \frac{C}{mol}$$

$$R = 8.314 \frac{J}{K \cdot mol}$$

$$T = 310 \text{ K}$$

#### Elektrodiffusion:

Der passive Fluss von Natrium-, Kalium-, Chloridionen und Protonen wird durch die Goldman-Hodgkin Gleichung beschrieben

#### Kalium: (Nicolli et al., 1991)

$$I_{Pot_{mito}}^{ed} = A_m \cdot P_{Pot_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{K_{in} - K_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{Pot_{mito}} = 2 \cdot 10^{-10} \frac{m}{s}$$

#### Natrium:

$$I_{Na_{mito}}^{ed} = A_m \cdot P_{Na_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{Na_{in} - Na_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{Na_{mito}} = 1 \cdot 10^{-11} \frac{m}{s}$$

#### Protonen: (Rolfe et al., 1994), (Krishnamoorthy and Hinkle, 1984)

$$I_{H_{mito}}^{ed} = -A_m \cdot P_{H_{mito}} \cdot U \cdot F \cdot \left( \frac{H_{in} - H_{mito} \cdot \exp(U)}{1 - \exp(U)} \right)$$

$$P_{H_{mito}} = 4 \cdot 10^{-4} \frac{m}{s}$$

#### Pumpen: (Bernardi, 1999)

Das pumpen von Natrium, Kalium und Phosphat wird als elektroneutraler, protonengetriebener Antiport beschrieben:

$$v_{Phos-exchanger} = V_{max}^{Phos-exchanger} (P_{in} \cdot H_{in} - P_{mito} \cdot H_{mito})$$

$$I_{Na_{mito}}^{pump} = V_{max}^{Na-pump} (Na_{in} \cdot H_{mito} - Na_{mito} \cdot H_{in})$$

$$I_{Pot_{mito}}^{pump} = V_{max}^{Pot-pump} (K_{in} \cdot H_{mito} - K_{mito} \cdot H_{in})$$

#### Komplex III: (Zhang et al., 2008), (Hendler et al., 1985), (Demin et al., 2001)

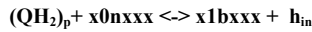
Der Zustandsraum von Komplex III wird durch ein Array bestehend aus zwei Zahlen, einem Buchstaben, zwei Zahlen und einem weiteren Buchstaben beschrieben. Die Zahlen bezeichnen den Reduktionszustand des jeweiligen funktionellen Teils von Komplex III, 0 steht für oxidiert, 1 für reduziert, und die Buchstaben den Bindungszustand von Semiubiquinon, n steht für nicht gebunden und b für gebunden. Von rechts nach links bezeichnet die Position im Array die folgenden funktionellen Teile: den Reduktionszustand von Cytochrom c1 (c1), den Reduktionszustand des Eisen-Schwefel-Clusters (Fe-S), den Bindungszustand von Semiubiquinon an der p-Seite (SQ<sub>p</sub>), den Reduktionszustand des niedrigen Häm b (b<sub>L</sub>), den Reduktionszustand des hohen Häm (b<sub>H</sub>) und den Bindungszustand von Semiubiquinon an der n-Seite (SQ<sub>n</sub>)

c1	Fe-S	SQ <sub>p</sub>	b <sub>L</sub>	b <sub>H</sub>	SQ <sub>n</sub>
0/1	0/1	n/b	0/1	0/1	n/b

Zum Beispiel steht 00n00n den vollständig oxidierten Komplex III ohne gebundenes Semiubiquinon, während 11b11b den vollständig reduzierten Komplex III bezeichnet, der sowohl auf der n-Seite als auch auf der p-Seite Semiubiquinon gebunden hat. 10n11b bezeichnet den Zustand von Komplex III, bei dem Cytochrom c1 reduziert, der Eisen-Schwefel-Cluster oxidiert, das niedrige und das hohe Häm b reduziert und Semiubiquinon an der n-Seite aber nicht an der p-Seite gebunden ist.

Es gibt sieben verschiedenen reversible elementare Prozesse beschrieben durch folgenden Ratengleichungen:

- Ubiquinol reagiert mit oxidierten Fe-S an der p-Seite. Dabei entsteht reduziertes Fe-S, an der p-Seite gebundenes Semiubiquinon und zwei Protonen werden ins Zytosol abgegeben:



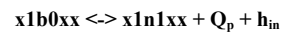
$$v_{SQ_p} = V_{\max}^{SQ_p} \left( (QH_2)_p \cdot x0nxxx - \frac{1}{K_{eq}^{SQ_p}} \cdot x1bxxx \right)$$

$$K_{eq}^{SQ_p} = \exp \left( \frac{f_V^{SQ_p} \cdot V \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \frac{h_{cyt}}{h_{ref}}$$

$$f_V^{SQ_p} = 0.1$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

- Reduktion des niedrigen Häm b und Freisetzung von Ubiquinon an der p-Seite:



$$v_{Q_p} = V_{\max}^{Q_p} \left( x1b0xx - \frac{1}{K_{eq}^{Q_p}} \cdot x1n1xx \cdot Q_p \right)$$

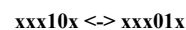
$$K_{eq}^{Q_p} = \exp \left( \frac{(E_0^{Q_p} + f_V^{Q_p} \cdot V) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \frac{h_{cyt}}{h_{ref}}$$

$$f_V^{Q_p} = 0.1$$

$$E_0^{Q_p} = 120$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

- Elektronentransfer zwischen dem niedrigen Häm b (b<sub>L</sub>) und dem hohen Häm b (b<sub>H</sub>):



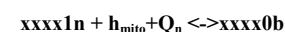
$$v_{hemes} = V_{\max}^{hemes} \left( xxx10x - \frac{1}{K_{eq}^{hemes}} \cdot xxx01x \right)$$

$$K_{eq}^{hemes} = \exp \left( \frac{(E_0^{hemes} + f_V^{hemes} \cdot V) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right)$$

$$f_V^{hemes} = 0.8$$

$$E_0^{hemes} = 80$$

- An der n-Seite reagiert Ubiquinon mit dem reduzierten b<sub>H</sub> zu oxidiertem b<sub>H</sub> und gebundenem SQ<sub>n</sub>:



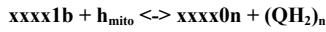
$$v_{SQ_n} = V_{\max}^{SQ_n} \left( Q_n \cdot \text{xxxx1n} - \frac{1}{K_{eq}^{SQ_n}} \cdot \text{xxxx0b} \right)$$

$$K_{eq}^{SQ_n} = \exp \left( \frac{(E_0^{SQ_n} + f_V^{SQ_n} \cdot V) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \frac{h_{mito}}{h_{ref}}$$

$$f_V^{SQ_n} = 0.1$$

$$E_0^{SQ_n} = 30$$

- **Reduziertes b<sub>H</sub> reagiert mit gebundenem SQ<sub>n</sub>:**



$$v_{(QH_2)_n} = V_{\max}^{(QH_2)_n} \left( \cdot \text{xxxx1b} - \frac{1}{K_{eq}^{(QH_2)_n}} \cdot \text{xxx0n} \cdot (QH_2)_n \right)$$

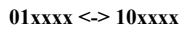
$$K_{eq}^{(QH_2)_n} = \exp \left( \frac{(E_0^{(QH_2)_n} + f_V^{(QH_2)_n} \cdot V) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right) \cdot \frac{h_{mito}}{h_{ref}}$$

$$f_V^{(QH_2)_n} = 0.1$$

$$E_0^{(QH_2)_n} = 130$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

- **Reduziertes Fe-S reagiert mit oxidiertem Cytochrom c1:**

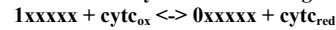


$$v_{cytc1} = V_{\max}^{cytc1} \left( 01\text{xxxx} - \frac{1}{K_{eq}^{cytc1}} \cdot 10\text{xxxx} \right)$$

$$K_{eq}^{cytc1} = \exp \left( \frac{E_0^{cytc1} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right)$$

$$E_0^{cytc1} = -35$$

- **Reduziertes Cytochrome c1 reagiert mit oxidiertem Cytochrom c:**



$$v_{cytc} = V_{\max}^{cytc} \left( 1\text{xxxxx} \cdot \text{cytc}_{ox} - \frac{1}{K_{eq}^{cytc1}} \cdot 0\text{xxxxx} \cdot \text{cytc}_{red} \right)$$

$$K_{eq}^{cytc} = \exp \left( \frac{E_0^{cytc} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right)$$

$$E_0^{cytc} = -10$$

**Complex I : (Brown and Brand, 1988; Hirst, 2005), (Efremov et al., 2010)**  
**(NADH + Q + 4 H<sub>mito</sub> ↔ NAD + QH<sub>2</sub> + 4 H<sub>in</sub>)**

Ähnlich wie in Komplex III wird der Zustandsraum für Komplex I durch einen Array der Länge 10 bestehend aus ganzen Zahlen beschrieben. Die erste Stelle beschreibt den Reduktionszustand des Flavins (FMN), das entweder vollständig reduziert, bezeichnet durch 2, oder als Flavinradikal, bezeichnet durch 1, oder vollständig oxidiert, bezeichnet durch 0, vorliegen kann. Die nächsten acht Stellen bezeichnen die Reduktionszustand der acht Eisen-Schwefel-Cluster, 1 für reduziert und 0 für oxidiert, während die letzte Stelle den Bindungszustand des Semiubiquinons (SQ), 1 für gebunden, 0 für ungebunden bezeichnet.

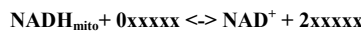
$$\begin{array}{cccccccccc}
 FMN & N3 & N1a & N1b & N4 & N5 & N6a & N6b & N2 & SQ \\
 \frac{2}{1/0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0}
 \end{array}$$

Insgesamt kommt man so auf 1536 möglich Zustände von Komplex I und zwölf elementare Übergangsprozesse, die 4480 Reaktionen ergeben. Dieses System wurde durch Zusammenfassen von den sehr ähnliche Mittelpunktpotentiale aufweisenden Eisen-Schwefel-Clustern N1b, N4, N5, N6a und N6b zu N\* stark vereinfacht. Die Besetzungen der übrigen Zustände war im vereinfachten System fast identisch mit dem ganzen System (ohne Ankopplung an den TCAC und die RC), die numerische Handhabbarkeit wurde durch das nun nur noch 96 Zustandvariablen, acht elementare Prozesse und 184 Reaktionen umfassende System stark verbessert. Für das mit TCAC und RC gekoppelte System wurde die reduzierte Version benutzt.

$$\begin{array}{cccccc}
 FMN & N3 & N1a & N^* & N2 & SQ \\
 \frac{2}{1/0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0} & \frac{1}{0}
 \end{array}$$

Es gibt acht verschiedene elementare Prozesse:

- Mitochondriales NADH reagiert mit oxidiertem FMN to  $NAD^+$  and vollständig reduziertem Flavin (frf (= fully reduced flavine)).

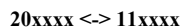


$$v_{frf} = V_{\max}^{frf} \left( NADH_{mito} \cdot 0xxxxx - \frac{1}{K_{eq}^{frf}} \cdot NAD_{mito}^+ \cdot 2xxxxx \right)$$

$$K_{eq}^{frf} = \exp \left( \frac{E_0^{frf} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right)$$

$$E_0^{frf} = -32mV$$

- Ein Elektron wird vom frf auf N3 übertragen:

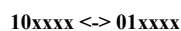


$$v_{frf-N3} = V_{\max}^{frf-N3} \left( 20xxxx - \frac{1}{K_{eq}^{frf-N3}} \cdot 11xxxx \right)$$

$$K_{eq}^{frf-N3} = \exp \left( \frac{E_0^{frf-N3} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000} \right)$$

$$E_0^{frf-N3} = 12mV$$

- Transfer eines Elektrons vom Flavinradikal auf N3:

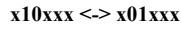


$$v_{fr-N3} = V_{\max}^{fr-N3} \left( 10xxxx - \frac{1}{K_{eq}^{fr-N3}} \cdot 01xxxx \right)$$

$$K_{eq}^{fr-N3} = \exp\left(\frac{E_0^{fr-N3} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right)$$

$$E_0^{fr-N3} = 170mV$$

- **Transfer eines Elektrons vom N3 auf N1a:**

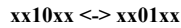


$$v_{N3-N1a} = V_{\max}^{N3-N1a} \left( x10xxx - \frac{1}{K_{eq}^{N3-N1a}} \cdot x01xxx \right)$$

$$K_{eq}^{N3-N1a} = \exp\left(\frac{E_0^{N3-N1a} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right)$$

$$E_0^{N3-N1a} = -135mV$$

- **Transfer eines Elektrons vom N1a auf N\*:**

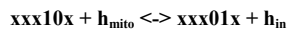


$$v_{N1a-N^*} = V_{\max}^{N1a-N^*} \left( xx10xx - \frac{1}{K_{eq}^{N1a-N^*}} \cdot xx01xx \right)$$

$$K_{eq}^{N1a-N^*} = \exp\left(\frac{E_0^{N1a-N^*} \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right)$$

$$E_0^{N1a-N^*} = 130mV$$

- **Transfer eines Elektrons vom N\* to N2, wobei ein Proton von der Matrix in das Zytosol gepumpt wird:**



$$v_{N^*-N2} = V_{\max}^{N^*-N2} \left( xxx10x - \frac{1}{K_{eq}^{N^*-N2}} \cdot xxx01x \right)$$

$$K_{eq}^{N^*-N2} = \exp\left(\frac{(V_{mm} + E_0^{N^*-N2}) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right) \cdot \frac{h_{mito}}{h_{in}}$$

$$E_0^{N^*-N2} = 150mV$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

- **Übertragen eines Elektrons von N2 auf Ubiquinon, wobei gebundenes SQ entsteht und ein Proton von der Matrix in das Zytosol gepumpt wird:**



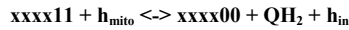
$$v_{N2-SQ} = V_{\max}^{N2-SQ} \left( Q \cdot xxxx10 - \frac{1}{K_{eq}^{N2-SQ}} \cdot xxxx01 \right)$$

$$K_{eq}^{N2-SQ} = \exp\left(\frac{(V_{mm} + E_0^{N2-SQ}) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right) \cdot \frac{(h_{mito})^2}{h_{in} \cdot h_{ref}}$$

$$E_0^{N2-SQ} = 185 mV$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

- **Transfer eines Elektrons vom N2 auf gebundenes SQ, wobei Ubiquinol freigesetzt wird und ein Proton von der Matrix in das Zytosol gepumpt wird:**



$$v_{N2-QH_2} = V_{max}^{N2-QH_2} \left( xxxx11 - \frac{1}{K_{eq}^{N2-QH_2}} \cdot xxxx00 \cdot QH_2 \right)$$

$$K_{eq}^{N2-QH_2} = \exp\left(\frac{(V_{mm} + E_0^{N2-QH_2}) \cdot F}{R \cdot T \cdot 1000}\right) \cdot \frac{(h_{mito})^2}{h_{in} \cdot h_{ref}}$$

$$E_0^{N2-SQ} = 225 mV$$

$$h_{ref} = 10^{-7}$$

**Komplex IV (Long et al., 2009), (Arnold and Kadenbach, 1999), (Napiwotzki and Kadenbach, 1998)**  
**(2 cyt\_red + O<sub>2</sub> + 4 H\_mito → H<sub>2</sub>O + 2 cyt\_ox + 2 H\_in)**

$$v_{C_4} = V_{max}^{C_4} \cdot \frac{cytC_{red}^n}{cytC_{red}^n + (K_m^{cytC_{red}})^n} \cdot \frac{O_{2mito}}{O_{2mito} + K_m^{O_2}} \left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^6$$

$$K_m^{O_2} = 0.001$$

$$n = A + B \frac{\left( \frac{ATP_{mito}}{ADP_{mito}} \right)^k}{\left( \frac{ADP_{mito}}{ADP_{mito}} \right)^k + \left( \frac{ATP}{K_n^{ADP}} \right)^k}$$

$$A = 1.1$$

$$B = 0.8$$

$$K_n^{ADP} = 24$$

$$k = 2.3$$

Der Faktor  $\left( \frac{h_{mito}}{h_{in}} \right)^6$  wurde einbezogen um eine ausreichende Aktivierung von Komplex IV mit erhöhtem Energiebedarf sicherzustellen.

## CAC

**Pyruvataustauscher: (Halestrap, 1975)**



(Pyr\_in + H\_mito <-> Pyr\_mito + H\_in)

$$v_{pyr-exchanger} = V_{\max}^{Pyr-exchanger} \cdot \frac{(Pyr_{in} \cdot H_{in} - Pyr_{mito} \cdot H_{mito})}{\left(1 + \frac{Pyr_{in}}{K_m^{Pyr_{in}}}\right) \left(1 + \frac{Pyr_{mito}}{K_m^{Pyr_{mito}}}\right)}$$

$$K_m^{Pyr_{in}} = 0.15$$

$$K_m^{Pyr_{mito}} = 0.15$$

**Pyruvatdehydrogenasekomplex (Blass and Lewis, 1973), (Land and Clark, 1973)**

(Pyr\_mito + CoA + NAD -> AcCoA + Co2 + NADH)

$$v_{pdhc} = V_{\max}^{pdhc} \left(1 + A_{\max}^{Ca_{mito}} \frac{Ca_{mito}}{Ca_{mito} + K_a^{Ca_{mito}}}\right) \left(\frac{Pyr_{mito}}{Pyr_{mito} + K_m^{Pyr}}\right) \left(\frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD_{mito}}}\right) \left(\frac{CoA_{mito}}{CoA_{mito} + K_m^{CoA_{mito}}}\right)$$

$$A_{\max}^{Ca_{mito}} = 1.7$$

$$K_a^{Ca_{mito}} = 10^{-3}$$

$$K_m^{Pyr} = 0.090$$

$$K_m^{NAD_{mito}} = 0.036$$

$$K_m^{CoA_{mito}} = 0.0047$$

**Zitratsynthase (Matsuoka and Srere, 1973),**

(Oxa + AcCoA -> Cit)

$$v_{cs} = V_{\max}^{cs} \left( \frac{Oxa_{mito}}{Oxa_{mito} + K_m^{Oxa} \left(1 + \frac{Cit_{mito}}{3.7}\right)} \right) \left( \frac{AcCoA_{mito}}{AcCoA_{mito} + K_m^{AcCoA} \cdot \left(1 + \frac{CoA_{mito}}{0.025}\right)} \right)$$

$$K_m^{Oxa} = 0.0045$$

$$K_m^{AcCoA} = 0.005$$

$$K_i^{Cit} = 3.7$$

$$K_i^{CoA} = 0.025$$

**Aconitase (Guarriero-Bobyleva et al., 1973),**

(Cit <-> IsoCit)

$$v_{Aco} = V_{\max}^{Aco} \frac{Cit_{mito} - \frac{IsoCit_{mito}}{K_{eq}^{Aco}}}{1 + \frac{Cit_{mito}}{K_m^{Cit}} + \frac{IsoCit_{mito}}{K_m^{IsoCit}}}$$

$$K_{eq}^{Aco} = 0.067$$

$$K_m^{Cit} = 0.48$$

$$K_m^{IsoCit} = 0.12$$

**NAD-abhängige Isozitatdehydrogenase (Rutter and Denton, 1988) (Willson and Tipton, 1980) (Rutter and Denton, 1989) (Willson and Tipton, 1979) (Lai and Clark, 1978)**

**(IsoCit + NAD -> akg + NADH)**

$$v_{icdh} = V_{\max}^{icdh} \left( \frac{IsoCit_{mito}^{n^{IsoCit}}}{IsoCit_{mito}^{n^{IsoCit}} + (K_m^{IsoCit})^{n^{IsoCit}}} \right) \left( \frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD} \cdot \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_i^{NADH}} \right)} \right)$$

$$n^{IsoCit} = 1.9$$

$$K_m^{IsoCit} = \frac{K_{m1}^{IsoCit}}{\left( 1 + \left( \frac{Ca_{mito}}{K_a^{Ca}} \right)^{n^{Ca}} \right)} + K_{m2}^{IsoCit}$$

$$K_{m1}^{IsoCit} = 0.11$$

$$K_{m2}^{IsoCit} = 0.06$$

$$K_a^{Ca} = 0.0074$$

$$n^{Ca} = 2$$

$$K_m^{NAD} = 0.091$$

$$K_i^{NADH} = 0.0041$$

**$\alpha$ -ketogluteratdehydrogenase (Faff-Michalak and Albrecht, 1993; Lai and Cooper, 1986; Luder et al., 1990; McCormack and Denton, 1979; Smith et al., 1974), (Lai and Cooper, 1986), (Luder et al., 1990), (Smith et al., 1974),**

**(akg + NAD + CoA -> SucCoA + NADH)**

$$v_{akdhc} = V_{\max}^{akdhc} \left( 1 - \frac{Ca_{mito}}{Ca_{mito} + K_i^{Ca}} \right) \left( \frac{akg_{mito}}{akg_{mito} + K_m^{akdhc}} \right) \left( \frac{NAD_{mito}}{NAD_{mito} + K_m^{NAD} \cdot \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_i^{NADH}} \right)} \right) \left( \frac{CoA}{CoA + K_m^{CoA} \cdot \left( 1 + \frac{SucCoA}{K_i^{SucCoA}} \right)} \right)$$

$$K_m^{akdhc} = \left( \frac{K_{m1}^{akdhc}}{\left( 1 + \frac{Ca_{mito}}{K_{i-akg}^{Ca}} \right)} + K_{m2}^{akgh} \right) \left( 1 + \frac{NADH_{mito}}{K_{i-akg}^{NADH}} \right)$$

$$K_{m1}^{akdhc} = 2.5$$

$$K_m^{NAD} = 0.021$$

$$K_i^{NADH} = 0.0045$$

$$K_m^{CoA} = 0.0013$$

$$K_i^{SucCoA} = 0.0045$$

**Succinyl-CoA Synthetase (Phillips et al., 2009), (Johnson et al., 1998), (Krivanek and Novakova, 1991), (Lynn and Guynn, 1978)**

**(SucCoA + ADP + P <=> Succ + CoA + ATP)**

$$K_{eq-succoas} = 3.63$$

$$v_{succoas-atp} = V_{\max-succoas-atp} \left( 1 + A_{\max}^P \cdot \left( \frac{P_{mito}^{n^P}}{P_{mito}^{n^P} + (K_m^P)^{n^P}} \right) \right) \left( \frac{SucCoA_{mito} \cdot ADP_{mito} \cdot P_{mito} - \frac{Succ_{mito} \cdot CoA_{mito} \cdot ATP_{mito}}{K_{eq-succoas}}}{\left( 1 + \frac{SucCoA_{mito}}{K_m^{SucCoA}} \right) \left( 1 + \frac{ADP_{mito}}{K_m^{ADP}} \right) \left( 1 + \frac{P_{mito}}{K_m^P} \right) + \left( 1 + \frac{Succ_{mito}}{K_m^{Succ}} \right) \left( 1 + \frac{CoA_{mito}}{K_m^{CoA}} \right) \left( 1 + \frac{ATP_{mito}}{K_m^{ATP}} \right) - 1} \right)$$

$$A_{\max}^P = 1.2$$

$$K_m^P = 2.5$$

$$n^P = 3$$

$$K_m^{SucCoA} = 0.041$$

$$K_m^{ADP} = 0.25$$

$$K_m^P = 0.72$$

$$K_m^{Succ} = 1.6$$

$$K_m^{CoA} = 0.056$$

$$K_m^{ATP} = 0.017$$

**Succinatdehydrogenase (Vinogradov et al., 1989), (Gutman and Silman, 1975)**

**(Succ + Q <=> Fum + QH<sub>2</sub>)**

$$v_{succdh} = V_{\max-succdh} \left( \frac{Succ_{mito} \cdot Q_n - \frac{Fum_{mito} \cdot (QH_2)_n}{K_{eq-succdh}}}{Succ_{mito} + K_m^{Succ} \left( 1 + \frac{Mal_{mito}}{K_i^{Mal}} \right)} \right)$$

$$K_{eq-succdh} = \exp \left( \frac{25 \cdot F}{R \cdot T} \right)$$

$$K_m^{Succ} = 1.6$$

$$K_i^{Mal} = 2.2$$

**Fumerase (Bock and Alberty, 1953; Kobayashi et al., 1981)**

**(Fum <=> Mal)**

$$v_{fum} = V_{\max-fum} \left( \frac{Fum_{mito} - \frac{Mal_{mito}}{K_{eq-fum}}}{1 + \frac{Fum_{mito}}{K_m^{Fum}} + \frac{Mal_{mito}}{K_m^{Mal}}} \right)$$

$$K_{eq-fum} = 4.4$$

$$K_m^{Fum} = 0.14$$

$$K_m^{Mal} = 0.3$$

Malatdehydrogenase (Lai and Clark, 1978), (Gelpi et al., 1992), (Jespersen, 1976)

(Mal + NAD <-> Oxa + NADH)

$$v_{mdh} = V_{\max-mdh} \left( \frac{Mal_{mito} \cdot NAD_{mito} - \frac{Oxa_{mito} \cdot NADH_{mito}}{K_{eq-mdh}}}{\left(1 + \frac{Mal_{mito}}{K_m^{Mal}}\right) \left(1 + \frac{NAD_{mito}}{K_m^{NAD}}\right) + \left(1 + \frac{Oxa_{mito}}{K_m^{Oxa}}\right) \left(1 + \frac{NADH_{mito}}{K_m^{NADH}}\right) - 1} \right)$$

$$K_{eq-mdh} = 1.2 \cdot 10^{-3}$$

$$K_m^{Mal} = 0.145$$

$$K_m^{NAD} = 0.06$$

$$K_m^{Oxa} = 0.017$$

$$K_m^{NADH} = 0.044$$

## Bibliographie

- Adrian, R.H., and Bryant, S.H., 1974. Repetitive Discharge in Myotonic Muscle-Fibers. *Journal of Physiology-London* 240, 505-515.
- Albers, D.S., and Beal, M.F., 2000. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *Journal of Neural Transmission-Supplement*, 133-154.
- Alle, H., Roth, A., and Geiger, J.R., 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325, 1405-8.
- Ambrosio, S., Ventura, F., Rosa, J.L., and Bartrons, R., 1991. Fructose 2,6-Bisphosphate in Hypoglycemic Rat-Brain. *Journal of Neurochemistry* 57, 200-203.
- Andrew, R.D., 1991. Seizure and Acute Osmotic Change - Clinical and Neurophysiological Aspects. *Journal of the Neurological Sciences* 101, 7-18.
- Andrew, R.D., and Macvicar, B.A., 1994. Imaging Cell-Volume Changes and Neuronal Excitation in the Hippocampal Slice. *Neuroscience* 62, 371-383.
- Armstrong, C.M., 2003. The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6257-6262.
- Arnold, S., and Kadenbach, B., 1999. The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett* 443, 105-8.
- Arthurs, O.J., and Boniface, S., 2002. How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends in Neurosciences* 25, 27-31.
- Attwell, D., and Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 1133-45.
- Ballanyi, K., Grafe, P., Serve, G., and Schlue, W.R., 1990. Electrophysiological Measurements of Volume Changes in Leech Neuropil Glial-Cells. *Glia* 3, 151-158.
- Barth, A.M.I., and Mody, I., 2011. Changes in Hippocampal Neuronal Activity During and After Unilateral Selective Hippocampal Ischemia In Vivo. *Journal of Neuroscience* 31, 851-860.
- Bartos, M., Vida, I., and Jonas, P., 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 45-56.
- Batke, J., Nazaryan, K.B., and Karapetian, N.H., 1988. Complex of Brain D-Phosphoglycerate Mutase and Gamma-Enolase and Its Reactivation by D-Glycerate 2,3-Bisphosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 264, 510-518.
- Benzi, G., Arrigoni, E., Marzatico, F., and Villa, R.F., 1979. Influence of Some Biological Pyrimidines on the Succinate Cycle during and after Cerebral-Ischemia. *Biochemical Pharmacology* 28, 2545-2550.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L., 2007. *Biochemistry*. Freeman, New York, N.Y.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews* 79, 1127-1155.
- Berndt, N., Bulik, S., and Holzhutter, H.G., 2012. Kinetic Modeling of the Mitochondrial Energy Metabolism of Neuronal Cells: The Impact of Reduced alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Activities on ATP Production and Generation of Reactive Oxygen Species. *Int J Cell Biol* 2012, 757594.
- Berndt, N., Hoffmann, S., Benda, J., and Holzhutter, H.G., 2011. The influence of the chloride currents on action potential firing and volume regulation of excitable cells studied by a kinetic model. *J Theor Biol* 276, 42-9.
- Blass, J.P., and Lewis, C.A., 1973. Kinetic properties of the partially purified pyruvate dehydrogenase complex of ox brain. *Biochem J* 131, 31-7.

- Blinova, K., Carroll, S., Bose, S.K., Smirnov, A.V., Harvey, J.J., Knutson, J.R., and Balaban, R.S., 2004. Steady state kinetic properties of NADH binding and utilization in the mitochondrial matrix. A NADH fluorescence lifetime study. *Biophysical Journal* 86, 469a-469a.
- Bock, R.M., and Alberty, R.A., 1953. Studies of the Enzyme Fumarase .1. Kinetics and Equilibrium. *Journal of the American Chemical Society* 75, 1921-1925.
- Bohnensack, R., 1982. The role of the adenine nucleotide translocator in oxidative phosphorylation. A theoretical investigation on the basis of a comprehensive rate law of the translocator. *J Bioenerg Biomembr* 14, 45-61.
- Bonavita, V., Amore, G., and Avellone, S., 1966. Molecular and Kinetic Properties of Lactate Dehydrogenase in Degenerating Peripheral Nerve. *Journal of the Neurological Sciences* 3, 340-&.
- Boutilier, R.G., 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol* 204, 3171-81.
- Boveris, A., and Navarro, A., 2008. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *Iubmb Life* 60, 308-314.
- Brockhaus, J., Ballanyi, K., Smith, J.C., and Richter, D.W., 1993. Microenvironment of Respiratory Neurons in the Invitro Brain-Stem-Spinal Cord of Neonatal Rats. *Journal of Physiology-London* 462, 421-445.
- Brown, G.C., and Brand, M.D., 1988. Proton/electron stoichiometry of mitochondrial complex I estimated from the equilibrium thermodynamic force ratio. *Biochem J* 252, 473-9.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., and Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications. *Journal of Neurochemistry* 94, 43-43.
- Butterworth, R.F., and Besnard, A.M., 1990. Thiamine-Dependent Enzyme Changes in Temporal Cortex of Patients with Alzheimers-Disease. *Metabolic Brain Disease* 5, 179-184.
- Buxton, R., 2010. Interpreting oxygenation-based neuroimaging signals: the importance and the challenge of understanding brain oxygen metabolism.
- Cai, Q., and Sheng, Z.H., 2009. Mitochondrial transport and docking in axons. *Experimental Neurology* 218, 257-267.
- Calingasan, N.Y., Baker, H., Sheu, K.F.R., and Gibson, G.E., 1994. Distribution of the Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in Rat-Brain. *Journal of Comparative Neurology* 346, 461-479.
- Carter, B.C., and Bean, B.P., 2009. Sodium Entry during Action Potentials of Mammalian Neurons: Incomplete Inactivation and Reduced Metabolic Efficiency in Fast-Spiking Neurons. *Neuron* 64, 898-909.
- Chakraba.U, and Kenkare, U.W., 1974. Dimerization of Brain Hexokinase Induced by Its Regulator Glucose-6-Phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 249, 5984-5988.
- Chalmers, S., and Nicholls, D.G., 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19062-19070.
- Chaudhry, F.A., Schmitz, D., Reimer, R.J., Larsson, P., Gray, A.T., Nicoll, R., Kavanaugh, M., and Edwards, R.H., 2002. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J Neurosci* 22, 62-72.
- Chazotte, B., and Hackenbrock, C.R., 1989. Lateral Diffusion as a Rate-Limiting Step in Ubiquinone-Mediated Mitochondrial Electron-Transport. *Journal of Biological Chemistry* 264, 4978-4985.

- Chih, C.P., and Roberts, E.L., 2003. Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 1263-1281.
- Chih, C.P., Lipton, P., and Roberts, E.L., 2001. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends in Neurosciences* 24, 573-578.
- Chun, J., Agulian, S., and Haddad, G.G., 1991. O<sub>2</sub> Tension in Adult and Neonatal Brain-Slices under Several Experimental Conditions. *Brain Research* 568, 159-164.
- Cohen, L.B., 1973. Changes in Neuron Structure during Action Potential Propagation and Synaptic Transmission. *Physiological Reviews* 53, 373-418.
- Cornelius, F., 1996. The sodium pump.
- Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y., 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-942.
- Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 341, 233-249.
- Crotty, P., Sangrey, T., and Levy, W.B., 2006. Metabolic energy cost of action potential velocity. *J Neurophysiol* 96, 1237-46.
- Darquie, A., Poline, J.B., Poupon, C., Saint-Jalmes, H., and Le Bihan, D., 2001. Transient decrease in water diffusion observed in human occipital cortex during visual stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9391-9395.
- De Palma, A., Prezioso, G., Spagnoletta, A., Genchi, G., and Scalera, V., 2010. The oxoglutarate/malate carrier of rat brain mitochondria operates by a uniport exchange mechanism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42, 371-379.
- DeFelice, L.J., and Goswami, T., 2007. Transporters as channels. *Annu Rev Physiol* 69, 87-112.
- Demin, O.V., Goryanin, I.I., Kholodenko, B.N., and Westerhoff, H.V., 2001. Kinetic modeling of energy metabolism and superoxide generation in hepatocyte mitochondria. *Molecular Biology* 35, 940-949.
- Devor, A., Sakadzic, S., Saisan, P.A., Yaseen, M.A., Roussakis, E., Srinivasan, V.J., Vinogradov, S.A., Rosen, B.R., Buxton, R.B., Dale, A.M., and Boas, D.A., 2011. "Overshoot" of O<sub>2</sub> Is Required to Maintain Baseline Tissue Oxygenation at Locations Distal to Blood Vessels. *Journal of Neuroscience* 31, 13676-13681.
- Dierks, T., Riemer, E., and Kramer, R., 1988. Reaction-Mechanism of the Reconstituted Aspartate Glutamate Carrier from Bovine Heart-Mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta* 943, 231-244.
- Duchen, M.R., 1992. Ca<sup>2+</sup>-Dependent Changes in the Mitochondrial Energetics in Single Dissociated Mouse Sensory Neurons. *Biochemical Journal* 283, 41-50.
- Efremov, R.G., Baradaran, R., and Sazanov, L.A., 2010. The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465, 441-U61.
- Elmaghrabi, M.R., Correia, J.J., Heil, P.J., Pate, T.M., Cobb, C.E., and Pilkis, S.J., 1986. Tissue Distribution, Immunoreactivity, and Physical-Properties of 6-Phosphofructo-2-Kinase Fructose-2,6-Bisphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5005-5009.
- Erecinska, M., and Silver, I.A., 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiration Physiology* 128, 263-276.
- Evans, N.T.S., Naylor, P.F.D., and Quinon, T.H., 1981. The Diffusion-Coefficient of Oxygen in Respiring Kidney and Tumor-Tissue. *Respiration Physiology* 43, 179-188.
- Faff-Michalak, L., and Albrecht, J., 1993. The two catalytic components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria:

- comparison of the response to in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia, and hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 18, 119-23.
- Fano, S., Behrens, C.J., and Heinemann, U., 2007. Hypoxia suppresses kainate-induced gamma-oscillations in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 18, 1827-1831.
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M., 1998. A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *Embo J* 17, 3297-308.
- Fisahn, A., Pike, F.G., Buhl, E.H., and Paulsen, O., 1998. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394, 186-189.
- Fishman, H.M., and Dorset, D.L., 1973. Letter: Comments on "Electrical fluctuations associated with active transport". *Biophys J* 13, 1339-42.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B.M., and Chinopoulos, C., 2003. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease: The Life Cycle of the Dopamine Neuron* 991, 111-119.
- Folberggr.J, Ljunggre.B, Norberg, K., and Siesjo, B.K., 1974. Influence of Complete Ischemia on Glycolytic Metabolites, Citric-Acid Cycle Intermediates, and Associated Amino-Acids in Rat Cerebral-Cortex. *Brain Research* 80, 265-279.
- Fox, M.D., and Raichle, M.E., 2007. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 700-711.
- Fox, P.T., Raichle, M.E., Mintun, M.A., and Dence, C., 1988. Nonoxidative Glucose Consumption during Focal Physiologic Neural Activity. *Science* 241, 462-464.
- Frohlich, F., Bazhenov, M., Iragui-Madoz, V., and Sejnowski, T.J., 2008. Potassium Dynamics in the Epileptic Cortex: New Insights on an Old Topic. *Neuroscientist* 14, 422-433.
- Gaitonde, M.K., Murray, E., and Cunningham, V.J., 1989. Effect of 6-Phosphogluconate on Phosphoglucose Isomerase in Rat-Brain Invitro and Invivo. *Journal of Neurochemistry* 52, 1348-1352.
- Garfinkel, L., Garfinkel, D., Matsiras, P., and Matschinsky, B., 1987. Kinetic-Properties of Hexokinase as Assembled with a Microcomputer Database. *Biochemical Journal* 244, 351-357.
- Gekakis, N., Johnson, R.C., Jerkins, A., Mains, R.E., and Sul, H.S., 1994. Structure, Distribution, and Functional Expression of the Phosphofructokinase-C Isozyme. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3348-3355.
- Gelpi, J.L., Dordal, A., Montserrat, J., Mazo, A., and Cortes, A., 1992. Kinetic studies of the regulation of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate. *Biochem J* 283 ( Pt 1), 289-97.
- Gibala, M.J., MacLean, D.A., Graham, T.E., and Saltin, B., 1998. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 275, E235-E242.
- Gibson, G.E., Park, L.C.H., Sheu, K.F.R., Blass, J.P., and Calingasan, N.Y., 2000. The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochemistry International* 36, 97-112.
- Gibson, G.E., Sheu, K.F.R., Blass, J.P., Baker, A., Carlson, K.C., Harding, B., and Perrino, P., 1988. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in the Brains and Peripheral-Tissues of Patients with Alzheimers-Disease. *Archives of Neurology* 45, 836-840.
- Gibson, G.E., Zhang, H., Sheu, K.F.R., Bogdanovich, N., Lindsay, J.G., Lannfelt, L., Vestling, M., and Cowburn, R.F., 1998. alpha-ketoglutarate dehydrogenase in Alzheimer brains bearing the APP670/671 mutation. *Annals of Neurology* 44, 676-681.



- Gimenez, C., Valdivie.F, and Mayor, F., 1974. Glycolysis in Brain and Liver of Rats with Experimentally Induced Phenylketonuria. *Biochemical Medicine* 11, 81-86.
- Gleichmann, M., Collis, L.P., Smith, P.J.S., and Mattson, M.P., 2009. Simultaneous single neuron recording of O-2 consumption,  $[Ca^{2+}]_i$  and mitochondrial membrane potential in glutamate toxicity. *Journal of Neurochemistry* 109, 644-655.
- Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., and Zilberberg, N., 2001. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2, 175-84.
- Gorell, J.M., Law, M.M., Lowry, O.H., and Ferrendelli, J.A., 1977. Levels of Cerebral Cortical Glycolytic and Citric-Acid Cycle Metabolites during Hypoglycemic Stupor and Its Reversal. *Journal of Neurochemistry* 29, 187-191.
- Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M., 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 447, 728-34.
- Guarriero-Bobyleva, V., Volpi-Becchi, M.A., and Masini, A., 1973. Parallel partial purification of cytoplasmic and mitochondrial aconitate hydratases from rat liver. *Eur J Biochem* 34, 455-8.
- Guix, F.X., Ill-Raga, G., Bravo, R., Nakaya, T., de Fabritiis, G., Coma, M., Miscione, G.P., Villa-Freixa, J., Suzuki, T., Fernandez-Busquets, X., Valverde, M.A., de Strooper, B., and Munoz, F.J., 2009. Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain* 132, 1335-1345.
- Gutman, M., and Silman, N., 1975. The steady state activity of succinate dehydrogenase in the presence of opposing effectors.II. Reductive activation of succinate dehydrogenase in presence of oxaloacetate. *Mol Cell Biochem* 7, 177-85.
- Hajos, N., Ellender, T.J., Zemankovics, R., Mann, E.O., Exley, R., Cragg, S.J., Freund, T.F., and Paulsen, O., 2009. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *European Journal of Neuroscience* 29, 319-327.
- Halestrap, A.P., 1975. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148, 85-96.
- Hansford, R.G., and Johnson, R.N., 1975. Steady-State Concentrations of Coenzyme a-Sh and Coenzyme-a Thioester, Citrate, and Isocitrate during Tricarboxylate Cycle Oxidations in Rabbit Heart-Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 250, 8361-8375.
- Hauser, H., Phillips, M.C., and Stubbs, M., 1972. Ion permeability of phospholipid bilayers. *Nature* 239, 342-4.
- Hendler, R.W., Bunow, B., and Rieske, J.S., 1985. Thermodynamic and kinetic considerations of Q-cycle mechanisms and the oxidant-induced reduction of cytochromes b. *J Bioenerg Biomembr* 17, 51-64.
- Herculano-Houzel, S., 2011. Scaling of Brain Metabolism with a Fixed Energy Budget per Neuron: Implications for Neuronal Activity, Plasticity and Evolution. *Plos One* 6.
- Hill, D.K., 1950. The Volume Change Resulting from Stimulation of a Giant Nerve Fibre. *Journal of Physiology-London* 111, 304-327.
- Hirst, J., 2005. Energy transduction by respiratory complex I - an evaluation of current knowledge. *Biochemical Society Transactions* 33, 525-529.
- Hodgkin, A., 1975. The optimum density of sodium channels in an unmyelinated nerve. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 270, 297-300.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F., 1952. A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *Journal of Physiology-London* 117, 500-544.
- Hodgkin, A.L., and Horowicz, P., 1959. The Influence of Potassium and Chloride Ions on the Membrane Potential of Single Muscle Fibres. *Journal of Physiology-London* 148, 127-160.

- Holzhütter, H.-G., and Kann, O., Neuronal excitation as a perturbation of the energetic and osmotic homeostasis: Implications for robust network behavior, 2008.
- Homer, L.D., Shelton, J.B., and Williams, T.J., 1983. Diffusion of Oxygen in Slices of Rat-Brain. *American Journal of Physiology* 244, R15-R22.
- Hoyer, S., and Krier, C., 1986. Ischemia and the Aging Brain - Studies on Glucose and Energy-Metabolism in Rat Cerebral-Cortex. *Neurobiology of Aging* 7, 23-29.
- Hu, Y.B., and Wilson, G.S., 1997. A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: Fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *Journal of Neurochemistry* 69, 1484-1490.
- Huang, H.M., Ou, H.C., Xu, H., Chen, H.L., Fowler, C., and Gibson, G.E., 2003. Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death. *Journal of Neuroscience Research* 74, 309-317.
- Huchzermeyer, C., Berndt, N., Holzhütter, H.G., and Kann, O., 2012. The oxygen consumption of three different activity states in a neuronal network of the hippocampus. in revision.
- Huchzermeyer, C., Albus, K., Gabriel, H.J., Otahal, J., Taubenberger, N., Heinemann, U., Kovacs, R., and Kann, O., 2008. Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO<sub>2</sub> and concomitant changes in mitochondrial redox state. *Journal of Neuroscience* 28, 1153-1162.
- Ikura, K., Narita, H., Sasaki, R., and Chiba, H., 1978. Immunochemical and Enzymatic Properties of "Bisphosphoglyceromutase-Phosphatase and Phosphoglyceromutase from Human Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* 89, 23-31.
- Indiveri, C., Dierks, T., Kramer, R., and Palmieri, F., 1991. Reaction-Mechanism of the Reconstituted Oxoglutarate Carrier from Bovine Heart-Mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 198, 339-347.
- Jentsch, T.J., 1996. Chloride channels: A molecular perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 303-310.
- Jespersen, N., 1976. Thermochemistry of Reaction Catalyzed by Malate Dehydrogenase. *Thermochimica Acta* 17, 23-27.
- Johnson, J.D., Muhonen, W.W., and Lambeth, D.O., 1998. Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. The enzymes incorporate the same alpha-subunit. *J Biol Chem* 273, 27573-9.
- Junge, W., Rumberg, B., and Schroder, H., 1970. The necessity of an electric potential difference and its use for photophosphorylation in short flash groups. *Eur J Biochem* 14, 575-81.
- Kager, H., Wadman, W.J., and Somjen, G.G., 2007. Seizure-like afterdischarges simulated in a model neuron. *Journal of Computational Neuroscience* 22, 105-128.
- Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., and Mount, D.B., 2008. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 4, 490-503.
- Kann, O., and Kovacs, R., 2007. Mitochondria and neuronal activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292, C641-C657.
- Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovacs, R., Wirtz, S., and Schuelke, M., 2011. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* 134, 345-358.
- Kasischke, K.A., Vishwasrao, H.D., Fisher, P.J., Zipfel, W.R., and Webb, W.W., 2004. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305, 99-103.

- Kasischke, K.A., Lambert, E.M., Panepento, B., Sun, A., Gelbard, H.A., Burgess, R.W., Foster, T.H., and Nedergaard, M., 2011. Two-photon NADH imaging exposes boundaries of oxygen diffusion in cortical vascular supply regions. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 68-81.
- Kasten, T.P., and Dunaway, G.A., 1993. Fructose 2,6-Bisphosphate - Changes during Neonatal Maturation and Aging of Rat and Potential Role in Regulation of Glucose-Utilization. *Mechanisms of Ageing and Development* 68, 37-45.
- Kasten, T.P., Mhaskar, Y., and Dunaway, G.A., 1993. Regulation of Brain 6-Phosphofructo-1-Kinase - Effects of Aging, Fructose-2,6-Bisphosphate, and Regional Subunit Distribution. *Molecular and Cellular Biochemistry* 120, 61-68.
- Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., and Bennett, J.P., 2006. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *Journal of Neuroscience* 26, 5256-5264.
- Kessler, R., and Eschrich, K., 2001. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Molecular Brain Research* 87, 190-195.
- Kim, S.G., and Ugurbil, K., 1997. Comparison of blood oxygenation and cerebral blood flow effects in fMRI: Estimation of relative oxygen consumption change. *Magnetic Resonance in Medicine* 38, 59-65.
- Kish, S.J., Lopes-Cendes, I., Guttman, M., Furukawa, Y., Pandolfo, M., Rouleau, G.A., Ross, B.M., Nance, M., Schut, L., Ang, L., and DiStefano, L., 1998. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. *Archives of Neurology* 55, 1299-1304.
- Kishore, N., Tewari, Y.B., and Goldberg, R.N., 1998. An investigation of the equilibrium of the reaction {L-aspartate(aq) plus 2-oxoglutarate(aq) = oxaloacetate(aq) plus L-glutamate(aq)}. *Journal of Chemical Thermodynamics* 30, 1373-1384.
- Ko, L.W., Sheu, K.F.R., Thaler, H.T., Markesbery, W.R., and Blass, J.P., 2001. Selective loss of KGDHC-enriched neurons in Alzheimer temporal cortex - Does mitochondrial variation contribute to selective vulnerability? *Journal of Molecular Neuroscience* 17, 361-369.
- Kobayashi, K., Yamanishi, T., and Tuboi, S., 1981. Physicochemical, catalytic, and immunochemical properties of fumarases crystallized separately from mitochondrial and cytosolic fractions of rat liver. *J Biochem* 89, 1923-31.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmannhorn, F., Grzeschik, K.H., and Jentsch, T.J., 1992. The Skeletal-Muscle Chloride Channel in Dominant and Recessive Human Myotonia. *Science* 257, 797-800.
- Kocha, T., Fukuda, T., Isobe, T., and Okuyama, T., 1990. Large-Scale Purification of Bovine Brain Lactate-Dehydrogenase by Affinity-Chromatography on Immobilized Colchicine. *Journal of Biochemistry* 107, 138-143.
- Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P.C., 1984. Non-Ohmic Proton Conductance of Mitochondria and Liposomes. *Biochemistry* 23, 1640-1645.
- Krivanek, J., and Novakova, L., 1991. A novel effect of vanadium ions: inhibition of succinyl-CoA synthetase. *Gen Physiol Biophys* 10, 71-82.
- Kussmaul, L., and Hirst, J., 2006. The mechanism of superoxide production by NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7607-7612.
- Lai, J.C., and Clark, J.B., 1978. Isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase in synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria: a comparison of their kinetic constants. *Biochem Soc Trans* 6, 993-5.

- Lai, J.C., and Cooper, A.J., 1986. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* 47, 1376-86.
- Lai, J.C.K., Walsh, J.M., Dennis, S.C., and Clark, J.B., 1977. Synaptic and Non-Synaptic Mitochondria from Rat-Brain - Isolation and Characterization. *Journal of Neurochemistry* 28, 625-631.
- LaManna, J.C., Chavez, J.C., and Pichiule, P., 2004. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *Journal of Experimental Biology* 207, 3163-3169.
- Land, J.M., and Clark, J.B., 1973. Effect of phenylpyruvate on pyruvate dehydrogenase activity in rat brain mitochondria. *Biochem J* 134, 539-44.
- LaNoue, K.F., Doumen, C., and Bittar, E.E., Studies of Physiological Control of ATP Synthesis, *Advances in Molecular and Cell Biology*, Vol. Volume 11. Elsevier 1995, pp. 207-232.
- Laughlin, S.B., van Steveninck, R.R.D., and Anderson, J.C., 1998. The metabolic cost of neural information. *Nature Neuroscience* 1, 36-41.
- Lenigerfollert, E., 1977. Direct Determination of Local Oxygen-Consumption of Brain Cortex In vivo. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 372, 175-179.
- Lennie, P., 2003. The cost of cortical computation. *Curr Biol* 13, 493-7.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M., 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.
- Long, J., Gao, F., Tong, L., Cotman, C.W., Ames, B.N., and Liu, J., 2009. Mitochondrial decay in the brains of old rats: ameliorating effect of alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res* 34, 755-63.
- Lu, B., Su, Y., Das, S., Liu, J., Xia, J., and Ren, D., 2007. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell* 129, 371-83.
- Luder, A.S., Parks, J.K., Frerman, F., and Parker, W.D., Jr., 1990. Inactivation of beef brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by valproic acid and valproic acid metabolites. Possible mechanism of anticonvulsant and toxic actions. *J Clin Invest* 86, 1574-81.
- Lutz, A., Greischar, L.L., Rawlings, N.B., Ricard, M., and Davidson, R.J., 2004. Long-term meditators self-induce high-amplitude gamma synchrony during mental practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16369-16373.
- Lynn, R., and Guynn, R.W., 1978. Equilibrium constants under physiological conditions for the reactions of succinyl coenzyme A synthetase and the hydrolysis of succinyl coenzyme A to coenzyme A and succinate. *J Biol Chem* 253, 2546-53.
- Lyubarev, A.E., and Kurganov, B.I., 1989. Supramolecular Organization of Tricarboxylic-Acid Cycle Enzymes. *Biosystems* 22, 91-102.
- Maas, E., and Bisswanger, H., 1990. Localization of the Alpha-Oxoacid Dehydrogenase Multienzyme Complexes within the Mitochondrion. *Febs Letters* 277, 189-190.
- Mackenzie, B., and Erickson, J.D., 2004. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 447, 784-95.
- Madsen, P.L., Cruz, N.F., Sokoloff, L., and Dienel, G.A., 1999. Cerebral oxygen/glucose ratio is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery: Excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19, 393-400.
- Maher, F., DaviesHill, T.M., and Simpson, I.A., 1996. Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochemical Journal* 315, 827-831.

- Malik, P., McKenna, M.C., and Tildon, J.T., 1993. Regulation of Malate-Dehydrogenases from Neonatal, Adolescent, and Mature Rat-Brain. *Neurochemical Research* 18, 247-257.
- Malinska, D., Kulawiak, B., Kudin, A.P., Kovacs, R., Huchzermeyer, C., Kann, O., Szewczyk, A., and Kunz, W.S., 2010. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1797, 1163-1170.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L., 2000. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology* 10, 1247-1255.
- Masamoto, K., Omura, T., Takizawa, N., Kobayashi, H., Katura, T., Maki, A., Kawaguchi, H., and Tanishita, K., 2003. Biphasic changes in tissue partial pressure of oxygen closely related to localized neural activity in guinea pig auditory cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 1075-1084.
- Mastrogiacomo, F., Bergeron, C., and Kish, S.J., 1993. Brain Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Activity in Alzheimers-Disease. *Journal of Neurochemistry* 61, 2007-2014.
- Matsuoka, Y., and Srere, P.A., 1973. Kinetic studies of citrate synthase from rat kidney and rat brain. *J Biol Chem* 248, 8022-30.
- Mayhew, J., Johnston, D., Martindale, J., Jones, M., Berwick, J., and Zheng, Y., 2001. Increased oxygen consumption following activation of brain: Theoretical footnotes using spectroscopic data from barrel cortex. *Neuroimage* 13, 975-987.
- McCormack, J.G., and Denton, R.M., 1979. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* 180, 533-44.
- McGoron, A.J., Nair, P., and Schubert, R.W., 1997. Michaelis-Menten kinetics model of oxygen consumption by rat brain slices following hypoxia. *Annals of Biomedical Engineering* 25, 565-572.
- McKenna, M.C., Tildon, J.T., Stevenson, J.H., Hopkins, I.B., Huang, X.L., and Couto, R., 1998. Lactate transport by cortical synaptosomes from adult rat brain: Characterization of kinetics and inhibitor specificity. *Developmental Neuroscience* 20, 300-309.
- Meieruge, W., Ulrich, J., and Stahelin, H.B., 1985. Morphometric Investigation of Nerve-Cells, Neuropil and Senile Plaques in Senile Dementia of the Alzheimer Type. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 4, 219-229.
- Merrill, D.K., and Guynn, R.W., 1976. Electroconvulsive Seizure - Investigation into Validity of Calculating Cytoplasmic Free  $[Nad^{+}]/[Nadh][H^{+}]$  Ratio from Substrate Concentrations of Brain. *Journal of Neurochemistry* 27, 459-464.
- Miller, A.L., and Corddry, D.H., 1981. Brain Carbohydrate-Metabolism in Developing Rats during Hypercapnia. *Journal of Neurochemistry* 36, 1202-1210.
- Mintun, M.A., Lundstrom, B.N., Snyder, A.Z., Vlassenko, A.G., Shulman, G.L., and Raichle, M.E., 2001. Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6859-64.
- Miwa, S., and Brand, M.D., 2003. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions* 31, 1300-1301.
- Mueggler, P.A., and Wolfe, R.G., 1978. Malate-Dehydrogenase - Kinetic Studies of Substrate Activation of Supernatant Enzyme by L-Malate. *Biochemistry* 17, 4615-4620.
- Muller, M., 2000. Effects of chloride transport inhibition and chloride substitution on neuron function and on hypoxic spreading-depression-like depolarization in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 97, 33-45.

- Muravchick, S., and Levy, R.J., 2006. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 105, 819-837.
- Napiwotzki, J., and Kadenbach, B., 1998. Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol Chem* 379, 335-9.
- Nedergaard, M., Kraig, R.P., Tanabe, J., and Pulsinelli, W.A., 1991. Dynamics of Interstitial and Intracellular Ph in Evolving Brain Infarct. *American Journal of Physiology* 260, R581-R588.
- Nicolli, A., Redetti, A., and Bernardi, P., 1991. The K<sup>+</sup> conductance of the inner mitochondrial membrane. A study of the inducible uniport for monovalent cations. *J Biol Chem* 266, 9465-70.
- Niessing, J., Ebisch, B., Schmidt, K.E., Niessing, M., Singer, W., and Galuske, R.A.W., 2005. Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* 309, 948-951.
- Nisselbaum, J.S., Bodansky, O., and Packer, D.E., 1964. Comparison of Actions of Human Brain Liver + Heart Lactic Dehydrogenase Variants on Nucleotide Analogues + on Substrate Analogues in Absence + in Presence of Oxalate + Oxamate. *Journal of Biological Chemistry* 239, 2830-&.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E., 2011. AMPK Is a Direct Adenylate Charge-Regulated Protein Kinase. *Science* 332, 1433-1435.
- Oakhill, J.S., Chen, Z.P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N.M., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E., 2010. beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19237-19241.
- Offenhauser, N., Thomsen, K., Caesar, K., and Lauritzen, M., 2005. Activity-induced tissue oxygenation changes in rat cerebellar cortex: interplay of postsynaptic activation and blood flow. *Journal of Physiology-London* 565, 279-294.
- Olsson, T., Broberg, M., Pope, K.J., Wallace, A., MacKenzie, L., Blomstrand, F., Nilssonc, M., and Willoughby, J.O., 2006. Cell swelling, seizures and spreading depression: An impedance study. *Neuroscience* 140, 505-515.
- Orlowski, J., and Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447, 549-65.
- Park, L.C.H., Calingasan, N.Y., Sheu, K.F.R., and Gibson, G.E., 2000. Quantitative alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity staining in brain sections and in cultured cells. *Analytical Biochemistry* 277, 86-93.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J., 2011. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1152-66.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J., 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia* 55, 1251-1262.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., and Magistretti, P.J., 1998. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental Neuroscience* 20, 291-299.
- Penhoet, E.E., Kochman, M., and Rutter, W.J., 1969. Molecular and Catalytic Properties of Aldolase C. *Biochemistry* 8, 4396-&.
- Phillips, D., Aponte, A.M., French, S.A., Chess, D.J., and Balaban, R.S., 2009. Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry* 48, 7140-9.

- Powers, W.J., Videen, T.O., Markham, J., Black, K.J., Golchin, N., and Perlmutter, J.S., 2008. Cerebral mitochondrial metabolism in early Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28, 1754-1760.
- Powers, W.J., Videen, T.O., Markham, J., McGee-Minnich, L., Antenor-Dorsey, J.V., Hershey, T., and Perlmutter, J.S., 2007. Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2945-2949.
- Purich, D.L., and Fromm, H.J., 1971. Kinetics and Regulation of Rat Brain Hexokinase. *Journal of Biological Chemistry* 246, 3456-&.
- Quistorff, B., Secher, N.H., and Van Lieshout, J.J., 2008. Lactate fuels the human brain during exercise. *Faseb Journal* 22, 3443-3449.
- Requardt, R.P., Wilhelm, F., Rillich, J., Winkler, U., and Hirrlinger, J., 2010. The biphasic NAD(P)H fluorescence response of astrocytes to dopamine reflects the metabolic actions of oxidative phosphorylation and glycolysis. *Journal of Neurochemistry* 115, 483-492.
- Rolfe, D.F.S., and Brown, G.C., 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77, 731-758.
- Rolfe, D.F.S., Hulbert, A.J., and Brand, M.D., 1994. Characteristics of Mitochondrial Proton Leak and Control of Oxidative-Phosphorylation in the Major Oxygen-Consuming Tissues of the Rat. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1188, 405-416.
- Romero, M.F., Fulton, C.M., and Boron, W.F., 2004. The SLC4 family of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters. *Pflugers Arch* 447, 495-509.
- Rothman, S.M., 1985. The Neurotoxicity of Excitatory Amino-Acids Is Produced by Passive Chloride Influx. *Journal of Neuroscience* 5, 1483-1489.
- Rutter, G.A., and Denton, R.M., 1988. Regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca<sup>2+</sup> ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD<sup>+</sup> ratios. *Biochem J* 252, 181-9.
- Rutter, G.A., and Denton, R.M., 1989. Rapid purification of pig heart NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase. Studies on the regulation of activity by Ca<sup>2+</sup>, adenine nucleotides, Mg<sup>2+</sup> and other metal ions. *Biochem J* 263, 445-52.
- Ryzlak, M.T., and Pietruszko, R., 1987. Purification and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase from Human-Brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 255, 409-418.
- Sacktor, B., Wilson, J.E., and Tieckert, C.G., 1966. Regulation of Glycolysis in Brain in Situ during Convulsions. *Journal of Biological Chemistry* 241, 5071-&.
- Sadek, H.A., Humphries, K.M., Szweda, P.A., and Szweda, L.I., 2002. Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406, 222-228.
- Sahlin, K., Harris, R.C., and Hultman, E., 1975. Creatine-Kinase Equilibrium and Lactate Content Compared with Muscle Ph in Tissue Samples Obtained after Isometric-Exercise. *Biochemical Journal* 152, 173-180.
- Santos, S.S., Gibson, G.E., Cooper, A.J.L., Denton, T.T., Thompson, C.M., Bunik, V.I., Alves, P.M., and Sonnewald, U., 2006. Inhibitors of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex alter [1-C-13] glucose and [U-C-13] glutamate metabolism in cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Research* 83, 450-458.
- Sasaki, T., Matsuki, N., and Ikegaya, Y., 2007. Metastability of active CA3 networks. *Journal of Neuroscience* 27, 517-528.
- Schultz, V., and Lowenstein, J.M., 1978. Purine Nucleotide Cycle - Studies of Ammonia Production and Interconversions of Adenine and Hypoxanthine Nucleotides and Nucleosides by Rat-Brain Insitu. *Journal of Biological Chemistry* 253, 1938-1943.

- Schurr, A., West, C.A., and Rigor, B.M., 1988. Lactate-Supported Synaptic Function in the Rat Hippocampal Slice Preparation. *Science* 240, 1326-1328.
- Schuster, R., and Holzutter, H.G., 1995. Use of Mathematical-Models for Predicting the Metabolic Effect of Large-Scale Enzyme-Activity Alterations - Application to Enzyme Deficiencies of Red-Blood-Cells. *European Journal of Biochemistry* 229, 403-418.
- Schwark, W.S., Singhal, R.L., and Ling, G.M., 1971. Metabolic Control Mechanisms in Mammalian Systems - Regulation of Pyruvate Kinase in Rat Cerebral Cortex. *Journal of Neurochemistry* 18, 123-&.
- Sechi, G., Rosati, G., Deiana, G.A., Petrucci, V., Deriu, F., Correddu, P., and De Riu, P.L., 1997. Co-variation of free amino acids in brain interstitial fluid during pentylenetetrazole-induced convulsive status epilepticus. *Brain Res* 764, 230-6.
- Segal, J.R., 1972. Electrical fluctuations associated with active transport. *Biophys J* 12, 1371-90.
- Segal, J.R., 1974. Letter: Reply to "Comments on electrical fluctuations associated with active transport". *Biophys J* 14, 513-4.
- Sengupta, B., Stemmler, M., Laughlin, S.B., and Niven, J.E., Action potential energy efficiency varies among neuron types in vertebrates and invertebrates. *PLoS Comput Biol* 6, e1000840.
- Sharma, H.K., and Rothstein, M., 1984. Altered Brain Phosphoglycerate Kinase from Aging Rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 25, 285-296.
- Shulman, R.G., Hyder, F., and Rothman, D.L., 2001. Lactate efflux and the neuroenergetic basis of brain function. *Nmr in Biomedicine* 14, 389-396.
- Shulman, R.G., Hyder, F., and Rothman, D.L., 2009. Baseline brain energy supports the state of consciousness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11096-101.
- Shuttleworth, C.W., Brennan, A.M., and Connor, J.A., 2003. NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* 23, 3196-3208.
- Simpson, D.P., and Angielsk.S, 1973. Regulation by Bicarbonate Ion of Intramitochondrial Citrate Concentration in Kidney Mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta* 298, 115-123.
- Smith, C.M., Bryla, J., and Williams.Jr, 1974. Regulation of Mitochondrial Alpha-Ketoglutarate Metabolism by Product Inhibition at Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 249, 1497-1505.
- Srivastava, L.K., and Baquer, N.Z., 1985. Purification and Properties of Rat-Brain Pyruvate-Kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236, 703-713.
- Starkov, A.A., and Fiskum, G., 2003. Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of Neurochemistry* 86, 1101-1107.
- Stein, W.D., 2002. Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells. *Int Rev Cytol* 215, 231-58.
- Sumegi, B., and Srere, P.A., 1984. Complex-I Binds Several Mitochondrial Nad-Coupled Dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 259, 5040-5045.
- Suzuki, F., Umeda, Y., and Kato, K., 1980. Rat-Brain Enolase Isozymes - Purification of 3 Forms of Enolase. *Journal of Biochemistry* 87, 1587-1594.
- Sykova, E., 2005. Glia and volume transmission during physiological and pathological states. *Journal of Neural Transmission* 112, 137-147.
- Szutowicz, A., Stepień, M., Lysiak, W., and Angielski, S., 1975. Purification and Kinetic-Properties of Atp - Citrate Oxaloacetate Lyase from Rat-Brain. *Journal of Neurochemistry* 25, 11-20.



- Takanaga, H., Mackenzie, B., and Hediger, M.A., 2004. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflügers Arch* 447, 677-82.
- Tata, D.A., and Anderson, B.J., 2002. A new method for the investigation of capillary structure. *Journal of Neuroscience Methods* 113, 199-206.
- Terwel, D., Bothmer, J., Wolf, E., Meng, F.P., and Jolles, J., 1998. Affected enzyme activities in Alzheimer's disease are sensitive to antemortem hypoxia. *Journal of the Neurological Sciences* 161, 47-56.
- Therien, A.G., and Blostein, R., 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279, C541-C566.
- Thompson, M.F., and Bachelar, H.S., 1970. Cerebral-Cortex Hexokinase - Comparison of Properties of Solubilized Mitochondrial and Cytoplasmic Activities. *Biochemical Journal* 118, 25-&.
- Thomsen, K., Pjilgaard, H., Gjedde, A., Bonvento, G., and Lauritzen, M., 2009. Principal Cell Spiking, Postsynaptic Excitation, and Oxygen Consumption in the Rat Cerebellar Cortex. *Journal of Neurophysiology* 102, 1503-1512.
- Traub, R.D., Whittington, M.A., Colling, S.B., Buzsaki, G., and Jefferys, J.G.R., 1996. Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *Journal of Physiology-London* 493, 471-484.
- Tretter, L., and Adam-Vizi, V., 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *Journal of Neuroscience* 20, 8972-8979.
- Tretter, L., and Adam-Vizi, V., 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience* 24, 7771-7778.
- Tretter, L., Sipos, I., and Adam-Vizi, V., 2004. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochemical Research* 29, 569-577.
- Uhlhaas, P.J., and Singer, W., 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 100-113.
- Vaishnavi, S.N., Vlassenko, A.G., Rundle, M.M., Snyder, A.Z., Mintun, M.A., and Raichle, M.E., 2010. Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17757-17762.
- Vannucci, R.C., and Brucklacher, R.M., 1994. Cerebral Mitochondrial Redox States during Metabolic Stress in the Immature Rat. *Brain Research* 653, 141-147.
- Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Pilakis, S.J., and Bartrons, R., 1992. Bovine Brain 6-Phosphofructo-2-Kinase Fructose-2,6-Bisphosphatase - Evidence for a Neural-Specific Isozyme. *Journal of Biological Chemistry* 267, 17939-17943.
- Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacin, M., Endou, H., and Kanai, Y., 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch* 447, 532-42.
- Vinogradov, A.D., Kotlyar, A.B., Burov, V.I., and Belikova, Y.O., 1989. Regulation of succinate dehydrogenase and tautomerization of oxaloacetate. *Adv Enzyme Regul* 28, 271-80.
- Vishwasrao, H.D., Heikal, A.A., Kasischke, K.A., and Webb, W.W., 2005. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25119-25126.
- Vora, S., Oskam, R., and Staal, G.E.J., 1985. Isoenzymes of Phosphofructokinase in the Rat - Demonstration of the 3 Non-Identical Subunits by Biochemical, Immunochemical and Kinetic-Studies. *Biochemical Journal* 229, 333-341.
- Vovenko, E., 1999. Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 437, 617-623.

- Whittington, M.A., Faulkner, H.J., Doheny, H.C., and Traub, R.D., 2000. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 86, 171-190.
- Willson, V.J., and Tipton, K.F., 1979. Purification and characterization of ox brain NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Neurochem* 33, 1239-47.
- Willson, V.J., and Tipton, K.F., 1980. Allosteric properties of ox brain nicotinamide--adenine dinucleotide dependent isocitrate dehydrogenase. *J Neurochem* 34, 793-9.
- Woo, N.S., Lu, J.M., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D.B., Deutch, A.Y., Lovinger, D.M., and Delpire, E., 2002. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12, 258-268.
- Yager, J.Y., Brucklacher, R.M., and Vannucci, R.C., 1992. Cerebral Energy-Metabolism during Hypoxia-Ischemia and Early Recovery in Immature Rats. *American Journal of Physiology* 262, H672-H677.
- Yamamoto, M., Hamasaki, N., Maruta, Y., and Tomonaga, M., 1990. Fructose 2,6-Bisphosphate Changes in Rat-Brain during Ischemia. *Journal of Neurochemistry* 54, 592-597.
- Zahler, R., Zhang, Z.T., Manor, M., and Boron, W.F., 1997. Sodium kinetics of Na,K-ATPase alpha isoforms in intact transfected HeLa cells. *Journal of General Physiology* 110, 201-213.
- Zhang, H., Chobot, S.E., Osyczka, A., Wraight, C.A., Dutton, P.L., and Moser, C.C., 2008. Quinone and non-quinone redox couples in Complex III. *J Bioenerg Biomembr* 40, 493-9.
- Zhu, L., Polley, N., Mathews, G.C., and Delpire, E., 2008. NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Research* 79, 201-212.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., and Hazell, A.S., 2004. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: An ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-C-13]glucose. *Neurotoxicology* 25, 573-587.

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Abbildung 1.1 wurde von Sabrina Hoffman entworfen und stand Pate für Abbildung 2.1. Abbildung 5.2 wurde von Sascha Bulik entworfen, der auch den Komplex I mit voller Komplexität in C++ implementiert und mit der reduzierten Version aus Kapitel 5 verglichen hat.

Berlin, 31. Juli 2012

## **Danksagung**

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter für die Betreuung meiner Doktorarbeit, den sehr fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch und die Möglichkeit eigene Forschungsinteressen und Herangehensweisen umzusetzen.

Weiter gilt mein Dank meinen experimentellen Partnern Prof. Dr. Oliver Kann und Dr. Christine Huchzermeyer für die experimentellen Daten und den wissenschaftlichen Austausch.

Zuletzt Danke ich noch meinen Kollegen Sascha Bulik, Johannes Eckstein, Sabrina Hoffmann und Matthias König für allerlei technische, moralische und fachliche Unterstützung.